FRESENIUS'
ZEITSCHRIFT FÜR ANALYTISCHE CHEMIE

BEGRÜNDET VON REMIGIUS FRESENIUS

HERAUSGEGEBEN VON

W. FRESENIUS UND A. KURTENACKER

141. BAND

DRITTES HEFT

MIT 13 ABBILDUNGEN IM TEXT

SPRINGER-VERLAG BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

J. F. BERGMANN · MÜNCHEN

1954

Z.anal. Chem.

Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie.

Begründet 1862 und herausgegeben bis Band 20 (1881) von *C. Remigius Fresenius*, bis Band 36 (1897) von *C. Remigius* und *Heinrich Fresenius*, Band 37—58 herausgegeben von *Heinrich* und *Wilhelm Fresenius* und *Ernst Hinz*, Band 59 (1920) bis Band 105 von *Wilhelm Remigius* und *Ludwig Fresenius*, Band 105 (1936) von *Remigius* und *Ludwig Fresenius*, Band 106—127 (1944) von *Remigius Fresenius*, Band 128 (1948) herausgegeben von *A. Kurtenacker* und ab Band 129 (1949) von *W. Fresenius* und *A. Kurtenacker*.

Bis Band 58 (1919) Wiesbaden, C. W. Kreidel, Band 59—62 (1922) Wiesbaden, C. W. Kreidel und München, J. F. Bergmann, Band 53—127 (1944) München, J. F. Bergmann, ab Band 128 (1948) München, Bergmann und Berlin, Springer.

Die **„Zeitschrift für analytische Chemie"** erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials in Heften, die zu Bänden vereinigt werden. Der Preis des Bandes beträgt DM 58,—. Sie bringt als „Originalabhandlungen" selbständige Untersuchungen aus allen Gebieten der analytischen Chemie.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskripts und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophote u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Der „Bericht über die Fortschritte der analytischen Chemie" enthält, zum Teil in Form von Sammelberichten, kritische Referate über die auf den einzelnen Gebieten an anderer Stelle veröffentlichten Arbeiten über analytische Chemie.

Originalarbeiten und alle sie betreffenden Zuschriften sind zu richten an die

Redaktion der Zeitschrift für analytische Chemie,
Wiesbaden, Kapellenstraße 11/15.

Für Originalabhandlungen wird ein Unkostenersatz von DM 32,— je Druckbogen, jedoch nicht mehr als 1½ Druckbogen für einen Beitrag vergütet.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 40 Sonderdrucke.

Auf möglichst rasche Veröffentlichung der eingelaufenen Arbeiten wird besonderer Wert gelegt.

J. F. Bergmann
München 27, Trogerstraße 56
Fernsprecher 40535

Springer-Verlag
Heidelberg, Neuenheimer Landstraße 24
Fernsprecher 2440
Berlin W 35, Reichpietschufer 20
Fernsprecher 249251

Vertriebsvertretung im Ausland;
Lange, Maxwell & Springer Ltd., 242 Marylebone Rod, London N. W. 1

Band 141 — **Inhaltsverzeichnis.** — Heft 3

Originalabhandlungen. Seite

Brüggemann, J., W. Krauss und **J. Tiews,** Zur Methodik der chemischen Vitamin A- und D-Bestimmung mit elektrophilen Metallhalogeniden. III. Zur Bestimmung von Vitamin A mit $FeCl_3$. Mit 5 Textabbildungen 161

Brüggemann, J., W. Krauss und **J. Tiews,** Zur Methodik der chemischen Vitamin A- und D-Bestimmung mit elektrophilen Metallhalogeniden. IV. Verfahrensvorschläge zur chemischen Vitamin A-Bestimmung mit elektrophilen Metallhalogeniden in biologischem Material 173

Zahn, H., und **R. Kockläuner,** Zur Bestimmung von Phenolen mit 2,4-Dinitrofluorbenzol. II. Spaltung von Dinitrophenyläthern durch Amine . 183

Castiglioni, A., und **G. Bionda,** Über den Nachweis des Heliotropins in Vanillin-Heliotropinmischungen 189

Stumpf, K. E., Zur Bestimmung von Natriumcarbonat in Schwefelnatrium 190

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Warenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Brüggemann).
Chemisches Laboratorium und Laboratorium für Vitaminforschung und Prüfung.

Zur Methodik der chemischen Vitamin A- und D-Bestimmung mit elektrophilen Metallhalogeniden.

III. Zur Bestimmung von Vitamin A mit $FeCl_3$.

Von

Johannes Brüggemann, Walther Krauss und Jürgen Tiews.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. November 1953.)

In zwei vorangehenden Arbeiten[1] haben wir empfindliche und eindeutige Methoden zur Bestimmung von Vitamin A angegeben. Wir haben gezeigt, wie man im Falle der Verwendung eines zweiphasischen Systems mit $SbCl_5$ in konzentrierter Salzsäure eine Stabilisierung des bei der Carr-Price-Reaktion störenden Abfalles der Extinktion des blauen Farbkomplexes erreichen kann und welche verfahrenstechnischen Maßnahmen bei der Untersuchung im einphasischen System anzuwenden sind, um in jedem Falle einwandfreie Ergebnisse zu erhalten.

Wir möchten allerdings keinen Zweifel daran lassen, daß alle Methoden, die das UV-Absorptionsspektrum oder die Spektren der polarisierten Komplexe benützen, lediglich die Angabe gestatten, daß eine Substanz bestimmt wurde, bei der die energetischen Verhältnisse der π-Elektronen oder einsamen Elektronenpaare denjenigen der angenommenen Substanz entsprechen. Es gibt bisher keine Möglichkeit, auf diesem Wege eindeutig die Aussage zu machen, daß in einer biologischen oder sonstigen Substanz tatsächlich die vermutete Verbindung nachgewiesen oder bestimmt wurde, es sei denn, daß der Ausschließlichkeitsbeweis auf anderem Wege geführt wurde. Dies ist aber bekanntlich praktisch nie der Fall und auch bei den geringen Mengen von beträchtlichen Schwierigkeiten begleitet. Die Verhältnisse werden um so schwieriger, je mehr sich die Absorption des polarisierten Zustandes nach 500 mμ verschiebt, weil dann nur noch 3 oder weniger Konjuenbindungen vorhanden sein müssen. Lediglich durch UR-Spektren wäre es auf physikalisch-chemischem Wege möglich, eindeutigere Angaben zu machen.

Wir versuchten nunmehr, das Antimonchlorid durch $FeCl_3$ zu ersetzen und wieder, wegen der früher aufgefundenen Stabilisierung, in einem diphasischen System mit konzentrierter Salzsäure zu arbeiten. Wir hofften, durch die sehr geringe Löslichkeit von $FeCl_3$ in Chloroform Störungen unterbinden zu können, die wir im diphasischen System bei

Verwendung von $SbCl_5$ wegen dessen beträchtlicher Löslichkeit erhielten, und die namentlich bei Herabsetzung der Oberflächenspannung vornehmlich bei der Untersuchung biologischer Substanzen in Erscheinung traten.

Bei dem vorliegenden Reagens handelt es sich um eine Lösung von $FeCl_3$ in konzentrierter Salzsäure, versetzt mit CH_3COCl, bei dem eine Lösung des Komplexpartners in der Chloroformphase nur schwer erfolgt. Um nach der Durchführung der Stabilisierungsreaktionen das Reagens in die Chloroformphase zu bringen, war die gesonderte Anwendung von Essigsäureanhydrid notwendig.

Wir erreichten bei der Verwendung dieses Reagenses wieder eine Stabilisierung, wie sie in der Veröffentlichung I beschrieben wurde. Hierbei lag der molare Extinktionskoeffizient $\left(\varepsilon = \frac{1}{c \cdot d} \cdot \log \frac{Io}{I}\right)$ für Vitamin A-Alkohol oder -Ester wieder tiefer als der theoretisch zu erwartende Wert bei Filter S 61 und auch bei 620 mμ ($\varepsilon \sim 71{,}0 \cdot 10^3$ Lit. Mol^{-1} cm^{-1} gegenüber $\varepsilon = 128 \cdot 10^3$ Lit. Mol^{-1} cm^{-1} im einphasischen System).

Wir sprachen schon früher die Vermutung aus, daß bei der Stabilisierung ein oder mehrere reine Polyenkohlenwasserstoffe entstehen, wobei die Reaktionen in weitgehend reproduzierbarem Verhältnis zueinander verlaufen müssen. Für die Stabilisierung wurden damals Reaktionen an der Phasengrenzfläche unter Abspaltung eines Protons bzw. Aufnahme von Cl^- verantwortlich gemacht. Genau das gleiche müssen wir im Fall des $FeCl_3$-Reagenses annehmen, wobei allerdings vorauszusetzen ist, daß der Komplexpartner in Salzsäure wesentlich besser als in Chloroform löslich ist.

Wir glauben nunmehr, daß es zweckmäßig ist, über die sonst übliche Angabe der reinen Verfahrensvorschrift hinaus die Grundlagen der Methodik zu behandeln, die gerade bei den so oft ohne Kritik angewendeten colorimetrischen Verfahren mit polarisierten Molekülzuständen wesentlicher sind als sonst. Darüber hinaus müssen wir den Nachweis der Stabilisierungsreaktionen an der Grenzfläche führen, da sich hieraus eine weitere Verfeinerung des Verfahrens ergeben dürfte.

Grundlagen des Verfahrens.

a) Reaktionsprodukte an der reinen HCl-Grenzfläche.

Wird eine Lösung von Vitamin A-Alkohol oder -Ester in Chloroform mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure kurzzeitig geschüttelt, so erhält man in der Chloroformphase Substanzen, deren UV-Spektrum gegenüber dem reinen Vitamin A nach höheren Wellenlängen verschoben ist. Unterwirft man eine solche Lösung einer Carr-Price-Reaktion, wobei dem Reagens CH_3COCl zugesetzt ist, so erhält man statt des einen Maximums für Vitamin A (620 mμ) deren 2 (620 mμ und 570 mμ).

In Abb. 1 sind die Spektrogramme wiedergegeben. Dem UV-Maximum des Vitamins A (I) in Chloroform bei 332 mμ überlagert sind

weitere (373 mμ, 353 mμ, 340 mμ), die vom reinen Vitamin A unbekannt sind. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Maxima durch Überlagerung einzelner Gaussscher Kurven entstehen und daher nicht die genaue Lage angeben. Eine Auseinandertrennung ist schwierig und hier nicht notwendig. Es kämen als Verbindung infolge Reaktionen des Vitamin A-Kations (II) für die hohen Maxima in Frage: Anhydrovitamin A (III) oder Isoanhydrovitamin A (IV) bzw. die Alenform des

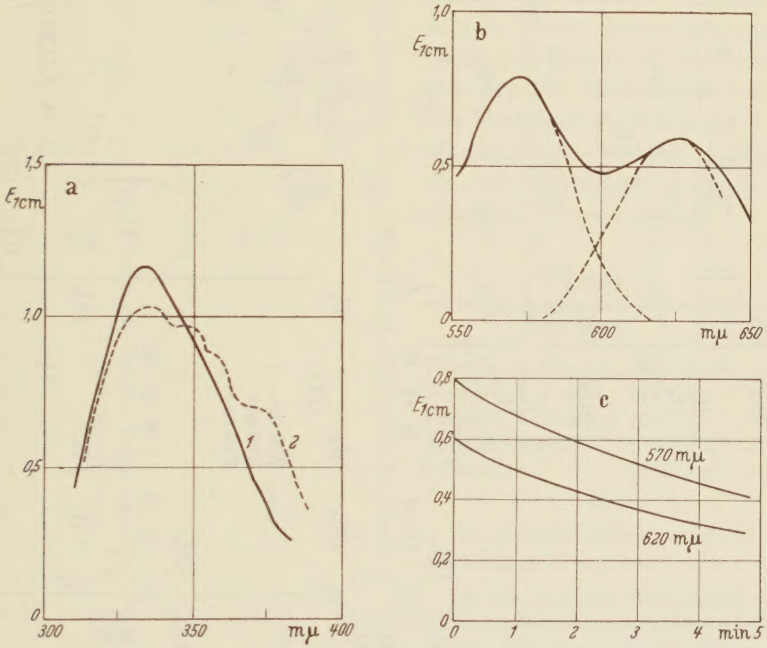
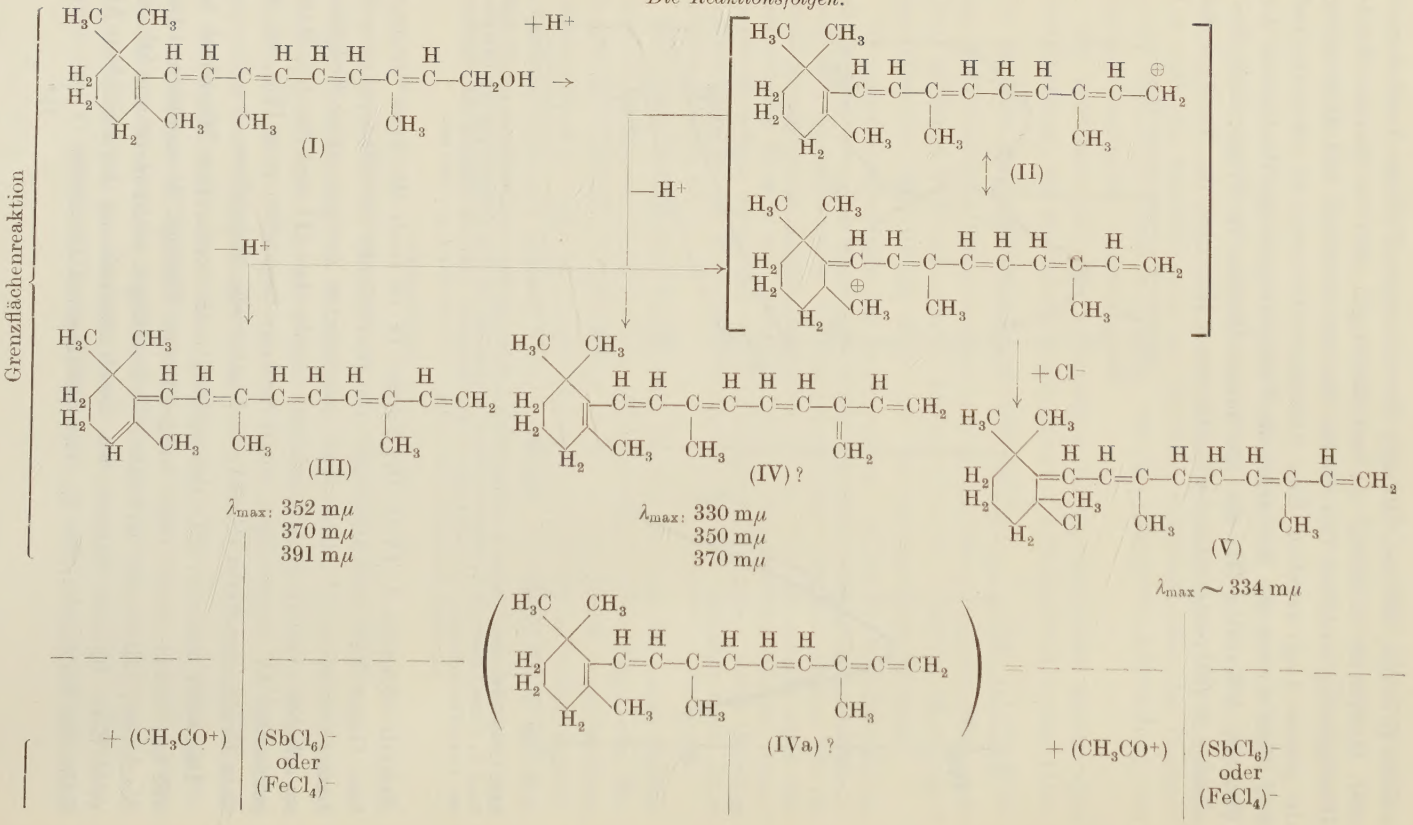


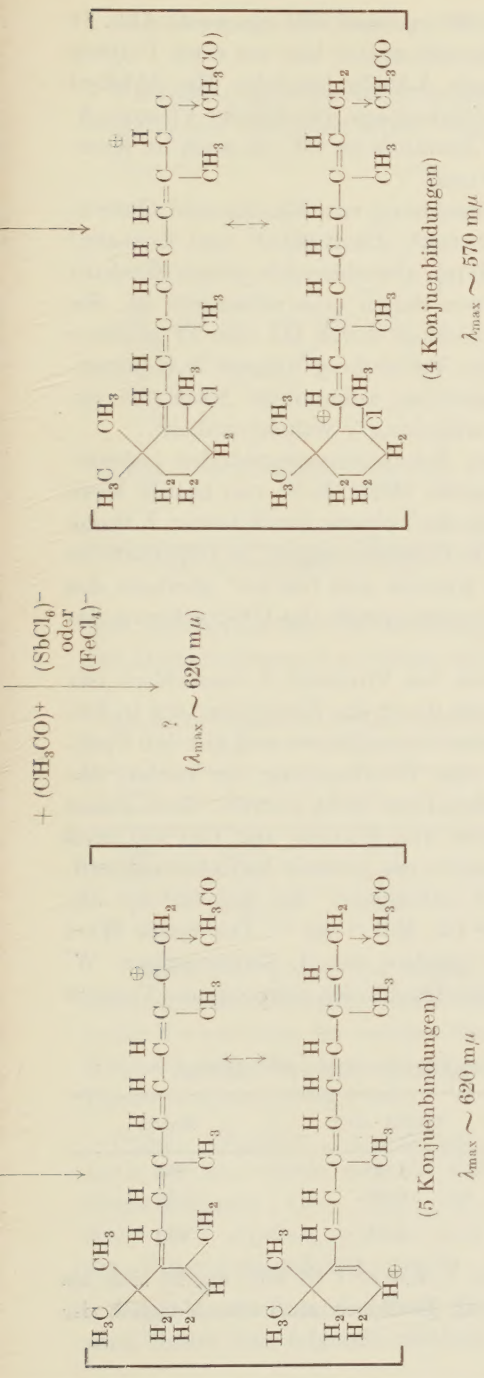
Abb. 1. Spektren von Vitamin A in Chloroform nach der Reaktion mit Salzsäure. 1a: UV-Spektrum (1. reines Vitamin A, 2. Substanz nach der Reaktion). 1b: Das Komplexspektrum (Reaktion mit Carr-Price-Reagens: 1 ml-Reagens: 1 ml Testlösung) nach der Reaktion mit Salzsäure. 1c: Abfall der Extinktion für λ_{max} = 570 mμ und λ_{max} = 620 mμ.

Anhydrovitamins A (IVa). Die Formel IV ist nach Meunier[10] angegeben. Gegen diese sind allerdings vom Standpunkt des Absorptionsspektrums sowohl im UV als auch im polarisierten Zustand einige Bedenken zu erheben. Das Komplexmaximum würde eher III und das UV-Maximum eher IV entsprechen, möglicherweise liegt aber auch IVa vor. In dem Reaktionsschema (S. 164) sind daher alle angegeben.

Das auch nach der HCl-Behandlung noch vorhandene Maximum bei 332 mμ könnte noch nicht umgesetztem Vitamin A zugehören. Den Nachweis, daß es sich bei beiden Verbindungen nicht mehr um Alkohol oder Ester handelt, führten wir durch Ausmessung des zeitlichen Abfalles der Extinktion von λ_{max} der polarisierten Zustände.

Die Reaktionsfolgen.





Nach bisher unveröffentlichten systematischen Versuchen an homologen Polyenreihen von KRAUSS und GRUND[6] ist die Geschwindigkeit des Abfalles der Extinktion des Primärkomplexes im gleichen Lösungsmittel jeweils in der Reihenfolge Alkohol > Ester > Aldehyd bzw. Polyen abgestuft. Nach den gleichen Verf. ergeben sich für die Halbwertszeiten τ_o des Extinktionsabfalles bei Verbindungen der Vitamin A-Reihe, die mit dem Spektrographen ermittelten Werte der Tab. 1*.

Tabelle 1.

Verbindung	τ_o (min)
Vitamin A-Alkohol (620 mμ)	~ 1
Vitamin A-Acetat (620 mμ)	~ 2
Vitamin A-Aldehyd (660 mμ)	~ 5
Anhydrovitamin (620 mμ)	~ 5
β-Carotin (920 mμ)	~ 5

Die Definition für τ_o wurde in der Abhandlung II gegeben[2].

Die dort mit dem Stufo gemessenen Halbwertszeiten liegen durchweg höher als die mit dem Spektrographen ermittelten. Der Grund hierfür ist in der Überstrahlung von Filter S 57 nach S 61 zu suchen. Im Verlauf der Reaktion entstehen Substanzen, die bei S 57 absorbieren, wegen der großen Halbwertsbreite der Filter nach S 61 überstrahlen und dadurch eine „Hemmung" des Extinktionsabfalles bei S 61 vortäuschen. Die Halbwertsbreite, die wir im Spektrographen anwandten, war ~ 2 mμ, so daß Überstrahlungen nicht eintraten.

* Über die Möglichkeit von Gruppenunterscheidungen auf diesem Wege wird an anderer Stelle später eingehend berichtet werden.

In unserem Falle ergab sich für 570 mμ und 620 mμ nach Abb. 1c $\tau_0 = 5$ min. Damit war sichergestellt, daß es sich hier um reine Polyene oder auch Polyenaldehyde der Vitamin A-Reihe handelte. Ein Aldehyd schied jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit aus. Der übliche Vitamin A-Aldehyd absorbiert sowohl in freiem Zustande im UV, als auch im Komplex im sichtbaren Licht höher (660 mμ).

Nach der schon angezogenen Untersuchung von Krauss und Grund, sowie nach Überlegungen von Meunier[9], Troitzkyi[11] und Collins[4] muß man annehmen, daß die bei 620 mμ absorbierende polare Struktur 6 Konjuenbindungen haben muß, von denen eine polarisiert ist. Sie dürfte daher mit einiger Wahrscheinlichkeit durch III oder IV gegeben sein. Der bei 570 mμ absorbierenden Verbindung müssen 5 Konjuenbindungen, von denen eine polarisiert ist, zukommen. Nach den experimentellen Umständen ist eine Verbindung V wahrscheinlich[5].

Daß wir es nicht mit 2 komplexen Ankuppelungszuständen (schwingungsfähigen Polyenketten) des gleichen Moleküls zu tun haben, kann in der Tatsache gesehen werden, daß die Polyene der Vitamin A-Reihe stets nur ein Absorptionsmaximum im Komplex zeigen, im Gegensatz zu Diphenylpolyenen, bei denen nach Krauss und Grund[6] oberhalb des Triens 2 Zustände möglich sind. Außerdem spricht das UV-Spektrum dagegen.

Den Beweis, daß bei der Reaktion des Vitamins A tatsächlich nur 2 Verbindungen entstehen, können wir durch die Ermittlung der in beiden Zuständen vorhandenen Konzentrationen führen, weil aus den Spektralkurven zu entnehmen ist, daß eine Überlagerung der beiden Absorptionsgebiete bei den Absorptionsmaxima nicht eintritt. Nach bisher ebenfalls unveröffentlichten Versuchen von Krauss und Grund[7] muß der bei 570 mμ absorbierenden Substanz ein molarer Extinktionskoeffizient $\varepsilon = 100 \cdot 10^3$ Lit. Mol^{-1} cm^{-1} zukommen, der bei 620 mμ absorbierenden Substanz $\varepsilon = 128 \cdot 10^3$ Lit. Mol^{-1} cm^{-1}. Der letzte Wert ist auch in Übereinstimmung mit Angaben von J. Brüggemann, W. Krauss und J. Tiews[3] für Filter S 61. Die für den angezogenen Versuch errechneten Werte ergibt Tab. 2.

Tabelle 2. *Vitamin A-Alkohol angewendet: 2,55 · 10^{-8} Mol/ml.*

λ_{max} mμ	$E_{o_{1\,cm}}$	Mol/ml · 10^{-8}	Mol %
570	1,60	1,60	64
620	1,16	0,91	36
	Summe	2,51	100

Aus dem UV-Spektrum nach Abb. 1, Kurve 1 (S. 163) ergibt sich als Vorgabe ebenfalls 2,55 · 10^{-8} Mole/ml. Demnach sind also lediglich die beiden Verbindungen entstanden.

b) Die spektrale Verteilung im diphasischen System in Gegenwart des Komplexbildners.

Wir haben nunmehr die Absorptionsspektra bei der Durchführung der analytischen Reaktion selbst aufgenommen. Zunächst seien in einem Beispiel die Verhältnisse bei Verwendung des $SbCl_5$-HCl-Reagenses RGS I (1, I) wiedergegeben. Nach

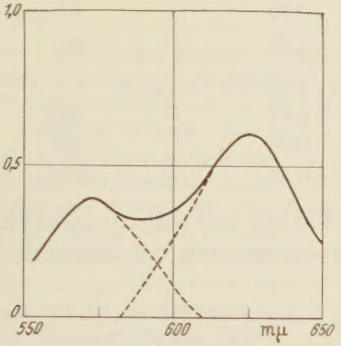


Abb. 2a. Spektrum der Komplexe von Vitamin A-Stabilisierungsprodukten nach der Reaktion mit RGS I im diphasischen System.

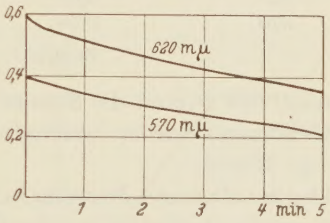


Abb. 2b.
Abfall der Extinktion für λ_{max} = 570 mμ und λ_{max} = 620 mμ.

Abb. 2a ergeben sich für den Komplex 2 Maxima (570 mμ und 620 mμ) Die Durchrechnung wie vorher ergibt folgende Werte (Tab. 3):

Tabelle 3. *Vitamin A-Alkohol angewendet: 0,86 · 10⁻⁸ Mol/ml.*

λ_{max} mμ	$E_{o\,1\,cm}$	Mol/ml · 10^{-8}	Mol %
620	0,63	0,50	58
570	0,40	0,40	46
	Summe	0,90	104

Auch hier geben die beiden Verbindungen mit den angegebenen Maxima unter Verwendung der entsprechenden Extinktionskoeffizienten die vorgelegte Konzentration richtig wieder.

Unter alleiniger Verwendung der Linie 620 mμ würde sich ein Extinktionskoeffizient $\varepsilon_o \sim 73{,}0 \cdot 10^3$ Lit. $Mol^{-1}\,cm^{-1}$ ergeben, wie er auch mit dem Filter S 61 gefunden wurde.

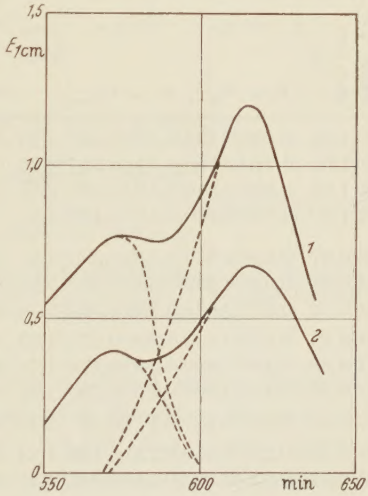


Abb. 3. Spektrum der Komplexe von Vitamin A-Stabilisierungsprodukten nach der Reaktion mit F6.

Unter Verwendung des $FeCl_3$-Reagenses „F 6", wie es hier beschrieben wird, findet man folgende spektrale Verteilungen (Abb. 3).

Tabelle 4.

λ_{max} mμ	$E_{o_{1\,cm}}$	Mol/ml · 10^{-8}	Mol %
Vitamin A-Alkohol angewendet: 1,70 · 10^{-8} Mole/ml			
620	1,20	0,94	55
570	0,75	0,75	44
	Summe	1,69	99
Vitamin A-Alkohol angewendet: 0,86 · 10^{-8} Mole/ml			
620	0,60	0,47	54,5
570	0,38	0,38	44,5
	Summe	0,85	99,0

Auch hier stimmt die Summe der bei 570 mμ und 620 mμ gefundenen Verbindungen wieder innerhalb der Fehlergrenze mit der vorgegebenen Menge überein.

Der bei alleiniger Messung bei 620 mμ (oder S 61) für die $FeCl_3$-Reaktion errechnete Extinktionskoeffizient ist $\varepsilon_o \sim 71 \cdot 10^3$ Lit. Mol $^{-1}$ cm $^{-1}$.

Nach dem Verlauf des Extinktionsabfalls haben wir es bei „F6" wie bei RGS I mit den gleichen Verbindungsgruppen zu tun haben, wie bei der Reaktion an der reinen HCl-Grenzfläche.

Tabelle 5.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
I.E. ml* (angewandt)	Mol · 10^{-8} / ml	620 mμ		570 mμ		$\frac{E\,620}{E\,570}$	Mol · 10^{-8}/ml		Σ Mol 10^{-8} / ml	Mol %		Σ Mol %	$\varepsilon_o \cdot 10^{-3}$	$\varepsilon \cdot 10^{-3}$
		$E_{1\,cm}$	$E_{o_{1\,cm}}$	$E_{1\,cm}$	$E_{o_{1\,cm}}$		620 mμ	570 mμ		620 mμ	570 mμ		620 mμ	620 mμ
10	1,05	0,790	0,830	0,350	0,350	2,25	0,620	0,380	1,00	59	36	95	79,0	75,0
10	1,05	0,720	0,750	0,300	0,320	2,26	0,590	0,320	0,91	56	30	86	71,5	69,5
10	1,05	0,800	0,840	0,350	0,380	2,26	0,660	0,380	1,04	63	36	99	80,0	76,0
9,5	1,00	0,720	0,750	0,440	0,460	1,64	0,560	0,460	1,02	56	46	102	75,0	72,0
8,3	0,87	0,620	0,650	0,340	0,380	1,80	0,510	0,380	0,840	60,6	41,6	102	74,8	71,0
8,0	0,84	0,620	0,650	0,320	0,340	1,94	0,510	0,340	0,850	60,6	40,6	101	77,3	73,5
8,0	0,84	0,600	0,620	0,335	0,360	1,74	0,490	0,360	0,850	57,3	43,0	100	75,0	71,3
6,0	0,63	0,420	0,440	0,260	0,270	1,63	0,340	0,270	0,610	54,0	43,0	97	69,7	66,8
6,0	0,63	0,430	0,460	0,260	0,270	1,71	0,360	0,270	0,630	57,2	43,0	100,2	73,2	68,4
6,0	0,63	0,425	0,460	0,275	0,290	1,58	0,360	0,290	0,650	57,2	45,8	103,0	73,2	67,6
4,8	0,50	0,35	0,38	0,17	0,18	2,10	0,295	0,180	0,480	58,5	36,0	94,5	76,0	70,0
3,0	0,315	0,230	0,240	0,125	0,130	1,84	0,190	0,130	0,320	60,4	41,3	101,7	76,2	73,6
3,0	0,315	0,210	0,220	0,130	0,140	1,57	0,172	0,140	0,312	54,8	44,6	99,4	70,3	67,0

* Vitamin A-Alkohol.

In Tab. 5 sind aus dem Versuchsmaterial einige Spektrogrammauswertungen zusammengestellt.

Die Spalten bedeuten: 1 und 2 die angewandte Menge Vitamin A-Alkohol in I. E. und Mol, 3—6 die Extinktionskoeffizienten bei 620 mμ und 570 mμ. $E_{1\,cm}$ ist der nach

der Durchführung der Reaktion gemessene Extinktionskoeffizient und $E_{o_{1\,cm}}$ der auf den Beginn der Reaktion aus dem Abfall extrapolierte, 7 ist das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten bei den beiden Wellenlängen, 8 und 9 sind die berechneten Molzahlen, 10 ist deren Summe, 11 und 12 sind die Molprozente der beiden Verbindungen, 13 ist deren Summe, 14 und 15 der für die Linie 620 mμ errechnete molare Extinktionskoeffizient zur Zeit „0" bzw. nach Beendigung der Reaktion.

Die angezogenen Beispiele zeigen, daß durch Summation der beiden Verbindungen innerhalb der Fehlergrenze die vorgesehene Menge richtig wiedergefunden wird, wobei allerdings von $1 \cdot 10^{-8}$ Mol/ml (10 I. E.) aufwärts stärkere Schwankungen auftreten können, deren Ursache in einem geänderten Verhältnis der Reaktionen zueinander zu suchen ist. Von $0{,}84 \cdot 10^{-8}$ Mol/ml = 8,0 I. E./ml abwärts verlaufen die beiden Reaktionen innerhalb einer bei kinetischen Messungen vertretbaren Fehlergrenze zu 58,2% ($\pm$4,2%) nach 620 mμ und zu 41,4% ($\pm$2%) nach 570 mμ. Die Extinktionskoeffizienten innerhalb dieses Konzentrationsbereiches sind $\varepsilon_o = 75{,}1 \cdot 10^3 \pm 2{,}8 \cdot 10^3$ Mol Lit.$^{-1}$cm^{-1} bzw. $\varepsilon = 70{,}0 \cdot 10^3 \pm 2{,}8 \cdot 10^3$ Mol Lit.$^{-1}$ cm^{-1} für 620 mμ.

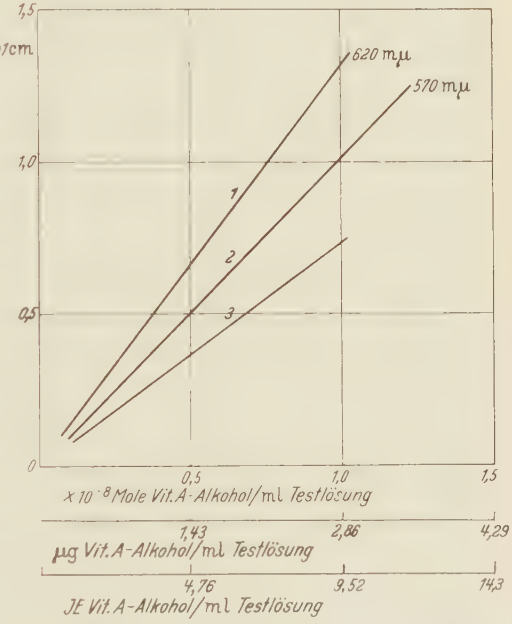


Abb. 4. Extinktions-Konzentrationskurven: 1. Substanz bei 620 mμ. 2. Substanz bei 570 mμ. 3. Berechnet aus der Absorption bei 620 mμ allein.

Somit ergibt sich nach dem Vorstehenden, daß man durchaus in der Lage ist, zwischen 0 und 9 I.E./ml mit einem Meßpunkt bei Filter S 61 auszukommen. Darüber können im Ablauf der Reaktion unter Umständen Schwankungen eintreten. Aber auch hier ist man prinzipiell in der Lage, die Messungen zu verwenden, wenn man mit einem Spektrographen bei 570 mμ und 620 mμ mißt und durch Einsetzen der molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{570\,m\mu} = 100 \cdot 10^3$ Lit. Mol^{-1} cm^{-1} bzw. $\varepsilon_{620\,m\mu} = 128 \cdot 10^3$ Lit. Mol^{-1} cm^{-1} die entsprechenden Konzentrationen ausrechnet, bzw. sie aus einer mit diesen Extinktionskoeffizienten aufgestellten Eichkurve (Abb. 4) abliest. Für die Korrektion des gefundenen Extinktionswertes auf die Zeit „0" ist der Meßwert um $\sim$ 5% je Minute zu erhöhen (Zeit gemessen vom Augenblick der Zugabe des Essigsäureanhydrids).

c) Verfahrensdurchführung.

Anfänglich ist schon gesagt worden, daß der Lösung von $FeCl_3$ in Salzsäure ein gleiches Volumen von CH_3COCl zugefügt wurde. Wir hatten ohne diesen Zusatz starke Schwankungen erhalten, die wir zunächst auf zu geringe Löslichkeit von $FeCl_3$ in Chloroform zurückführten, die durch den Zusatz verbessert werden sollte. Tatsächlich ist aber auch in Gegenwart von CH_3COCl die Löslichkeit noch sehr gering, wie man leicht zeigen kann. Nach neueren Untersuchungen von Krauss und Grund[8] neigen wir jedoch zu der Annahme, daß die bei der Reaktion gebildeten Polyenkohlenwasserstoffe durch einen nur elektrophilen Reaktionspartner, der nicht polar ist, gar nicht polarisiert werden können, sondern hierzu eines Cokatalysators bedürfen. Dieser mag oft in Chloroform als Phosgen oder Wasserspuren in variabler Menge vorliegen, doch scheint er sich bei $FeCl_3$ nicht hinreichend auszuwirken. Durch die Reaktion:

$$CH_3COCl + FeCl_3 \longrightarrow (CH_3CO^+)\,FeCl_4^-$$

wird im Kation der eigentliche Polarisator der Doppelbindung erzeugt.

Schüttelt man nun eine Vitamin A-Lösung mit einigen Tropfen des Reagenses, so tritt im allgemeinen eine geringe Färbung ein. Dies steht im Gegensatz zur Reaktion mit RGS I, bei der sich innerhalb 1 min beim Schütteln die maximale Färbung ausbildet. Den Grund hierfür glauben wir in der sehr geringen Löslichkeit des Komplexpartners in Chloroform sehen zu dürfen. Selbst wenn man die dunkelgelbe Lösung des Reagenses mit Chloroform schüttelt, tritt keine wesentliche Extinktion der Chloroformphase auf.

Man hat sich vorzustellen, daß beim $SbCl_5$-Reagens um den Tropfen eine Reagensschicht mit beträchtlicher Ausdehnung in die Chloroformphase vorliegt, innerhalb derer die Reaktionen ablaufen können.

Beim $FeCl_3$-Reagens ist diese Zone eng um den Tropfen begrenzt. Vitamin A reagiert nun schnell mit den Protonen der Grenzfläche zu den bezeichneten Produkten, die wieder in die Chloroformphase gelangen, und dort kein Reagens vorfinden. Wir glaubten daher, daß die Stabilisierungsreaktionen an der Grenzfläche besonders günstig ablaufen.

Es bestand nun die Aufgabe, nach der Durchführung der Stabilisierungsreaktion das Reagens aus den Tropfen in die Chloroformphase zu bringen. Dies erreichten wir durch vorsichtiges Zugeben einer geringen Menge Essigsäureanhydrid auf die Oberfläche. Man erkennt sofort, daß in der Grenzzone der blaue Farbton verstärkt wird, da hier die Löslichkeit des Reagenses erhöht ist. Man kann sich von der Verteilung des gelben Reagenses in der Grenzphase überzeugen, wenn man ohne Vitamin A-Lösung arbeitet. Die gelbe Farbe verschiebt sich nur in dem Maße in die Chloroformphase, wie die Grenzphase eingeschüttelt wird. Gäbe man von vornherein in die Testlösung Essigsäureanhydrid, so würde das

Reagens ausgeschwemmt, und die Reaktion verliefe in unkontrollierbarer Weise, weil das Reagens Vitamin A anträfe und nicht die umgewandelten Polyene. Dabei erlitte innerhalb der Schüttelzeit von 30 sec mindestens ein Teil des Vitamins A den von der CARR-PRICE-Reaktion bekannten Extinktionsabfall. Das Einschütteln soll in etwa 30 sec erfolgen. Diese Begründung erscheint uns notwendig, um die Verfahrensvorschrift zu erläutern, die sonst nicht plausibel wäre.

Experimentelles.

Als Vitamin A-Präparat wurde Vitamin A-Acetat verwendet, das uns dankenswerterweise von der Hoffmann-La Roche A.G., Basel/Grenzach, Baden, überlassen wurde.

Insoweit bei den Versuchen ein CARR-PRICE-Reagens verwendet wurde, bestand dies aus einer gesättigten Lösung von $SbCl_3$ in Chloroform, dem 4% CH_3COCl zugesetzt war. Über Reinigung des Chloroforms, sowie des CH_3COCl siehe die folgende Mitteilung IV. Von dem CARR-PRICE-Reagens wurde 1 ml auf 1 ml Testlösung verwendet. Bei den vorliegenden Vitamin A-Konzentrationen reichte dies aus, um den molaren Extinktionskoeffizienten richtig zu erhalten. Nach früheren Angaben von uns[3] enthält das dort angewendete CARR-PRICE-Reagens $\sim 215\ \mu g$ $SbCl_5$/ml bzw. $\sim 7 \cdot 10^{-7}$ Mole ml. Da wir nie über $2 \cdot 10^{-8}$ Mole Vitamin A/ml gemessen haben, ist ein genügender Überschuß an Reagens vorhanden. In diesem Zusammenhang möchten wir einen Irrtum richtig stellen, der in der zitierten Arbeit unterlaufen ist, der jedoch in keiner Weise die dortigen Ergebnisse beeinträchtigt, und auf den uns Herr K. H. WAGNER freundlicherweise hinwies. Bei der üblichen Konzentrationsangabe für die gesättigte CARR-PRICE-Lösung wird in der Literatur die in sich sinnentstellende Bezeichnung „22%ige Lösung" für 22 g $SbCl_3$ in *100* ml *Lösungsmittel* geführt. Eine gewichtsprozentige Lösung würde jedoch richtig bedeuten g/100 g *Lösung*. Wir hatten der Berechnung der gesättigten Lösung den letzten richtigeren Begriff zugrunde gelegt. Da jedoch der Gehalt an $SbCl_5$ direkt ermittelt wurde, ergibt sich lediglich, daß der Gehalt des Antimon(III)-chlorids an $SbCl_5 \sim 0{,}1$ Gew.% statt $\sim 0{,}06$ Gew.% ist.

K. H. WAGNER[12] hat in der Zwischenzeit die CARR-PRICE-Reaktion mit verschiedenen Reagensvolumina durchgeführt. Hierbei ist uns allerdings die Eichkurve für „0,25 ml-Lösung + 3 ml $SbCl_3$" nicht ganz verständlich, da sich aus ihr ein molarer Extinktionskoeffizient von 43000 Lit. Mol^{-1} cm^{-1} ergibt. Da WAGNER[12] nach etwa 10 sec gemessen hat, dürfte ein derartiger Abfall seiner Extinktion, ohne daß es im Experiment offensichtlich war, nicht eingetreten sein. Zum anderen müßte gerade bei einem Reagensüberschuß, wie er hier vorliegt, mit Sicherheit der übliche molare Extinktionskoeffizient erhalten werden, der wegen der Korrektur für die Messung nach 10 sec bei etwa $\varepsilon = 115 \cdot 10^3$ bis $120 \cdot 10^3$ Lit. Mol^{-1} cm^{-1} liegen dürfte mit einem Fehler von etwa $\pm 5\%$. Die anderen Kurven ergeben richtige molare Extinktionskoeffizienten.

$FeCl_3$-Reagens (F 6). Die salzsaure $FeCl_3$-Lösung bestand aus 5 g $FeCl_3$, krist. (p. a.) ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) auf 100 ml konzentrierte Salzsäure (p. a.), (Dichte 1,19). Zu

2 ml dieser Lösung werden 2 ml Acetylchlorid (p. a.) durch Überschichten in einer kleinen Schliffflasche (offen) langsam hinzugesetzt und die Reaktion, die durch den Wasserentzug eintritt, abgewartet (starkes Aufschäumen). Weiterhin werden benötigt: Essigsäureanhydrid (p. a.) und Chloroform DAB 6, sowie Aluminiumoxyd nach Brockmann.

Aufstellung der Eichkurve für Filter S 61 beim 1-Punktverfahren. Zur Herstellung der Standardlösung empfehlen wir die Verwendung des Vitamin A-USP-Standards, der 2500 I. E. = $2{,}62 \cdot 10^{-6}$ Mole Vitamin A je Kapsel enthält. Das zur Lösung verwendete, gereinigte, wasserfreie Chloroform soll zur Einstellung der entsprechenden Oberflächeneigenschaften, die für die Reaktion notwendig sind, eine 3 cm hohe Schicht eines teilweise desaktivierten Aluminiumoxyds im Chromatogrammrohr ($\varnothing$ = 2 cm) passiert haben, bevor es zum Lösen des Vitamin A-USP-Standards oder zur Herstellung einer Konzentrationsreihe verwendet wird. Hierzu sei auf die folgende Mitteilung IV, Abschnitt: Verwendete Reagenzien, Ziffer 5a und 9a, verwiesen.

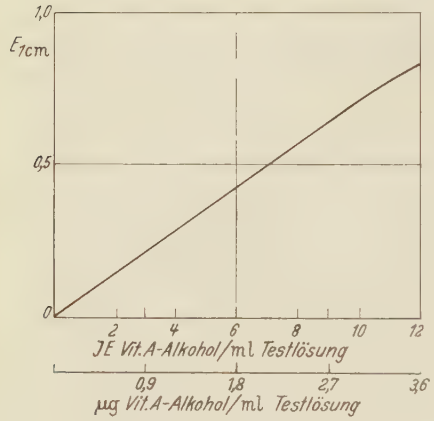


Abb. 5.
Eichkurve mit Reagens F 6 für Filter S 61.

Grundsätzlich soll die Farbreaktion auf Vitamin A mit Reagens F 6 nur mit einem Chloroform durchgeführt werden, dessen Oberflächeneigenschaften in der vorher angegebenen Weise standardisiert sind.

Zur Durchführung der Reaktion werden 2 ml chloroformischer Testlösung im Reagensglas (16 × 160 mm) mit 0,03 ml Reagens F 6 versetzt und etwa 20 sec kräftig hin und her geschwenkt (nicht geschüttelt). In dieser Zeit sind die Stabilisierungsreaktionen des Vitamins A an der Grenzfläche abgelaufen und ein wechselnder Teil der stabilisierten Produkte hat schon unter Bildung polarisierter Komplexe reagiert. Dieser Anteil ist vor allen Dingen bei der Untersuchung biologischer Materialien von der Anwesenheit mit in die chloroformische Endlösung eingebrachter Störstoffe abhängig.

Um die Farbreaktion quantitativ ablaufen zu lassen, werden jetzt 0,025—0,03 ml Essigsäureanhydrid vorsichtig auf die Oberfläche des Chloroforms pipettiert. In der Grenzfläche erfolgt eine starke Ausschwemmung des Komplexpartners unter weiterer Farbentwicklung. Die Grenzzone und damit die Farbvertiefung wird langsam von oben nach unten eingeschüttelt, was etwa in 30 sec beendet ist. Diese Methode führt schon nach kurzer Übung zu sicheren und reproduzierbaren Ergebnissen. Die Extinktionsermittlung des gebildeten blauen Farbkomplexes erfolgt in der Kleinküvette (d = 1 cm) des Pulfrich-Stufenphotometers bei Filter S 61. Die Ablesung wird etwa 90 sec nach Reaktionsbeginn vorgenommen. Abb. 5 zeigt die graphische Darstellung der für Filter S 61 ermittelten Eichkurve.

Die Durchführung der im allgemeinen Teil angewendeten 2-Punkte-Methode ist nach dem dortigen klar. Die Herstellung der Versuchslösung erfolgt wie vorher beschrieben. Die Messung selbst wird im Spektrographen bei den Wellenlängen 570 mµ und 620mµ durchgeführt. Die rechnerischen Einzelheiten sind nach den Angaben des allgemeinen Teiles sinngemäß durchzuführen. Es muß allerdings gewarnt werden, mit einem Colorimeter mit Spektralfiltern diese Messung etwa bei

S 57 und S 61 durchzuführen, da durch die große Halbwertsbreite der Filter Überstrahlungen eintreten. Für die Spektraluntersuchungen wurde das Zeißsche Spektralphotometer M 4 Q mit direkter Extinktionsanzeige verwendet.

Der deutschen Forschungsgemeinschaft haben wir für die Unterstützung der Arbeit bestens zu danken.

Literatur.

[1] Brüggemann, J., W. Krauss u. J. Tiews: diese Z. **135**, 241 (1951); **137**, 421 (1953). — [2] Brüggemann, J., W. Krauss u. J. Tiews: diese Z. **137**, 421 (1953). — [3] Brüggemann, J., W. Krauss u. J. Tiews: Chem. Ber. **85**, 315 (1952). — [4] Collins, F. D.: Nature (London) **165**, 818 (1950). — [5] Guérillut-Vinet, A., D. Meunier, I. Jouanneteau u. M. Gourevitch: C. R. Acad. Sci. **226**, 128 (1948). — [6] Krauss, W., u. H. Grund: erscheint Z. Elektrochem. — [7] Krauss, W., u. H. Grund: erscheint Z. Elektrochem. — [8] Krauss, W., u. H. Grund: Naturwissenschaften **40**, 18 (1953). — [9] Meunier, P.: C. R. Acad. Sci. **221**, 907 (1945). — Bull. Soc. chim. France, Mém. (5) **13**, 73 (1946). — [10] Meunier, P., u. U. L. Jouanneteau: Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **30**, 260 (1948). — [11] Troitzkyi, G. W.: nach Chem. Zbl. **1951**, I, 1127. — [12] Wagner, K. H.: Milchwissenschaft **8**, 287 (1953).

Prof. Dr. Dr. J. Brüggemann, München, Veterinärstr. 6.

Aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. J. Brüggemann).
Laboratorium für Vitaminforschung und Prüfung.

Zur Methodik der chemischen Vitamin A- und D-Bestimmung mit elektrophilen Metallhalogeniden.

IV. Verfahrensvorschläge zur chemischen Vitamin A-Bestimmung mit elektrophilen Metallhalogeniden in biologischem Material.

Von

Johannes Brüggemann, Walther Krauss und Jürgen Tiews.

(Eingegangen am 20. November 1953.)

In den bisherigen Mitteilungen I—III[2] werden analytische Verfahren zur Bestimmung von Vitamin A und Vitamin D angegeben, die auf der experimentell belegten Anschauung fußen, daß beide Vitamine mit Metallhalogeniden wie $SbCl_5$, $FeCl_3$ u. ä. im molekularen Verhältnis 1 : 1 reagieren.

Hierbei wurde gezeigt, daß es bei Verwendung kleinster Reagensvolumina und geeigneter Reaktionsführung möglich ist, über 1—2 min fast stabile Farbkomplexe des Vitamins A mit $FeCl_3$ zu erhalten, deren Extinktion bequem stufenphotometrisch ohne Zuhilfenahme lichtelektrischer Ablesevorrichtungen, wie sie sich in den letzten Jahren immer mehr zur Extinktionsermittlung bei der Carr-Price-Reaktion einführten, gemessen werden können.

Bisher über die Carr-Price-Reaktion bekannt gewordene Störungen, die im wesentlichen auf den starken Extinktionsabfall des gebildeten Vitamin A-$SbCl_5$-Komplexes auf Grund schnell ablaufender Sekundärreaktionen zurückzuführen sind, werden weitgehend vermieden, und die Methode durch Wegfall des bisher durch große Reagensvolumina bedingten Verdünnungseffektes empfindlicher gestaltet.

Da jedoch die Genauigkeit der früher unter I—III angegebenen Verfahren zur Bestimmung des Vitamins A in biologischen Materialien nicht nur von der Fehlerbreite der eigentlichen Farbreaktionen abhängt, sondern unter Umständen in viel stärkerem Maße von der Aufarbeitungstechnik beeinflußt wird, die zur weitgehenden Isolierung des Vitamins führen muß, ergibt sich die Notwendigkeit, auch über die Vorbereitung des zur Analyse gelangenden Untersuchungsmaterials zu berichten.

Hierbei ist im besonderen zu berücksichtigen, wie bisher auch stets vermerkt wurde, daß die Vitamine A und D mehr oder weniger reaktionsfähige Substanzen sind, die bei der Herauslösung aus ihren Begleitsubstanzen leicht verändert oder zerstört werden können. Es erscheint daher zweckmäßig, jedes Aufbereitungsverfahren zeitlich so kurz als möglich zu gestalten. Wir glauben nunmehr die Aufarbeitungstechnik für viele biologische Substanzen so durchgeführt zu haben, daß sie die bestmögliche Bestimmung des Vitamins A zuläßt, wobei wir uns vieler bisher bekannter Tatsachen bedienen.

Im folgenden sollen Vorschläge für die praktische Anwendung der in Mitteilung III von uns beschriebenen Reaktion des Vitamins A mit $FeCl_3$ unterbreitet werden, wie sie sich in dieser Form bei der Gehaltsbestimmung von Vitamin A in vielen biologischen Materialien seit etwa einem Jahr im hiesigen Institut gut bewährt haben. Unser besonderes Augenmerk galt neben der leicht zu handhabenden Farbreaktion des Vitamins A mit völlig unverderblichen Reagenzien einer einfachen, möglichst fehlerarmen und vor allen Dingen schnellen Aufbereitungstechnik, wie sie sich auch zur Reihenuntersuchung von Proben gut eignet.

Unter den verschiedenen getesteten, vitamin-A-haltigen Präparationen nahmen wiederum Produkte, wie sie besonders im landwirtschaftlichen Futtermittelsektor zur Vitaminversorgung eines ausgedehnten Viehbestandes der Bundesrepublik immer mehr in den Vordergrund treten, bisher aber wegen methodischer Schwierigkeiten nur unzureichend von sachverständiger Seite überwacht werden konnten, einen besonderen Raum ein.

Grundsätzlich hat sich bei eigenen Untersuchungen bestätigt, daß die durch den Aufbereitungsprozeß bedingten Verlustprozente an Vitamin A bei 2 an sich brauchbaren Verfahren immer bei dem wesentlich geringer sind, das auf schnellerem Wege zum Ziele führt.

Liegt beispielsweise ein festes oder öliges Vitamin A-Konzentrat in einer Untermischung mit Weizenmehl oder Kraftfuttergemengteilen, wie es etwa dem Typus der im landwirtschaftlichen Futtersektor sich zur Zeit durchsetzenden „Vitaminvormischung" entspricht, zur Testung vor, wäre dieses Material nach den bisher geltenden analytischen Regeln zunächst einer erschöpfenden, unter Umständen mehrstündigen Ätherextraktion zu unterziehen. Wollte man den leicht zur Bildung von Peroxyden neigenden Diäthyläther durch einen Petroläther niedrigen Siedepunktes ersetzen, so müßte man die Extraktionszeit in der Soxhletapparatur noch weiter verlängern. Im Falle eines stärker fetthaltigen Gemengteiles in der zu untersuchenden Probe machte sich nach der erschöpfenden Extraktion eine alkalische Verseifung der extrahierten Fettmenge notwendig. Damit ergäbe sich in solchen Fällen eine vielstündige Aufbereitungszeit, in der das empfindliche Vitamin A mehrfach das Lösungsmittel wechselt und der unverseifbare, vitamin-A-haltige Lipoidanteil dabei wiederholt bis zur Trockne eingeengt wird. Unsere Erfahrungen bestätigen, daß wegen der bekannten Oxydationsempfindlichkeit des Vitamins A sich gerade aus dem letzten aufgezeigten Punkt große Verlustquellen ergeben können.

Ein Verfahren, das derartig lange Aufbereitungszeiten durch direkte Verseifung der oben im Beispiel angezogenen Probe ohne vorhergehende Extraktion umgeht, wie es im weiteren Verlauf beschrieben wird, hat seinen Vorzug nicht nur in technischer Hinsicht, sondern auch im Hinblick auf die sehr kurze Verweildauer des aus seiner natürlichen oder sogar künstlich schützenden Umgebung herausgelösten Vitamins A in organischen Lösungsmitteln.

Wir gehen dabei keineswegs in unserer Ansicht mit L. Fuchs und E. Soos[3] überein, die die Haltbarkeit des Vitamins A in verschiedenen organischen Lösungsmitteln, wie sie im Verlauf des Aufbereitungsprozesses zur Anwendung kommen, prüften und bemerkenswerte Verluste an Vitamin A in Diäthyläther, Petroläther und Chloroform erst nach 24—48 Std Lagerungszeit feststellten. Unsere experimentellen Erfahrungen zeigen vielmehr, daß die Beobachtungen von Fuchs und Soos zwar zutreffen können, es aber keineswegs müssen, obgleich die selbstverständliche vorherige Reinigung der Lösungsmittel mit der dabei notwendigen Sorgfalt geschah.

Vor allen Dingen konnten teils erhebliche Verluste an Vitamin A bei Diäthylätherextraktionen beobachtet werden, wobei der Äther bei der Prüfung auf Peroxyde (Kaliumjodid-Stärkereaktion, 12 Std) auch in diesen Fällen keinerlei Reaktion zeigte. Zudem wurden die oben zitierten Haltbarkeitsuntersuchungen unter Lichtausschluß bei Zimmertemperatur durchgeführt, Bedingungen, wie sie sich für die Temperatur bei der üblichen Soxhletextraktion nicht und für das Licht nicht in allen Fällen leicht realisieren lassen.

Ob es sich bei den meist nicht reproduzierbaren Verlustquoten tatsächlich um eine nur oxydative Zerstörung des Vitamins A handelt, die man durch Arbeiten in einer Inertgasatmosphäre bei der Extraktion und der nachfolgenden Verseifung wirksam bekämpfen kann, erscheint uns

auch nach früheren Mitteilungen zweifelhaft. Wir sind vielmehr der Ansicht, daß hier vorläufig unkontrollierbare Umwandlungsvorgänge des Vitamins A bei längerem Arbeiten in organischen Lösungsmitteln eine Rolle spielen. Unsere Beobachtungen zeigen, daß Reaktionen des Vitamins A auch in der Stickstoffatmosphäre zu Verbindungen führen, die dann in Reaktion mit Metallhalogeniden ($SbCl_5$, $FeCl_3$) offenbar niedrigere Extinktionskoeffizienten bei 620 mμ besitzen als für den Vitamin A-$SbCl_5$ (bzw. $FeCl_3$)-Komplex bekannt ist. Zudem liegt das Absorptionsmaximum dieser Verbindungen häufig nicht mehr bei 620 mμ, sondern eine spektrale Verschiebung zu niedrigeren Wellenlängen (570 mμ) mußte festgestellt werden. Wir haben deshalb auf das Arbeiten im permanenten Inertgasstrom im Laufe des Analysenganges verzichtet, verwenden allerdings, da wir vorwiegend im völlig offenen System experimentieren, kleine Sicherungszusätze von Hydrochinon als Oxydationsschutz.

Diese bewähren sich besonders dann, wenn das aufzubereitende Material vorwiegend mineralischer Natur ist und aus fütterungstechnischen Gründen mit lebensnotwendigen Spurenelementen (Fe, Cu, Mn, Co) angereichert worden ist. Es konnte in vielen Beleganalysen gezeigt werden, daß der katalytische Einfluß derartiger Spurenelemente auf die Oxydation des empfindlichen Vitamins A durch kleine Hydrochinonzusätze weitgehend ausgeschaltet werden kann, wenn die Isolierung des Vitamins A den späteren Vorschlägen entsprechend auf zeitlich kurzem Wege erreicht wird.

Wodsak[5] weist schon 1950 auf die Schwierigkeiten einer Vitamin A-Analytik bei Gegenwart von Spurenelementen hin und möchte die biologische Testierung in A-vitaminierten Mineralstoffmischungen des landwirtschaftlichen Fütterungssektors durchgeführt wissen. Wir schließen uns ihm insofern an, als wir bei Anwendung der bisher üblichen Arbeitsvorschriften in derartigen Mineralstoffmischungen ebenfalls keine brauchbaren Ergebnisse erzielen konnten.

Da die Gefahr von Oxydation und anderen Umwandlungsprozessen ganz wesentlich mit der Verweildauer des Lösungsmittels ansteigt, waren wir bemüht, diese so kurz wie möglich zu gestalten und die Zahl der verschiedenen Lösungsmittel weitgehend einzuschränken.

Aufarbeitungsverfahren.

a) Allgemeine Bemerkungen:

Bei der Aufbereitung der verschiedenen biologischen Substanzen zur Bestimmung ihres Vitamin A-Gehaltes verdanken wir das Vorgehen in den folgenden Punkten 2—4 einer freundlichen Privatmitteilung der Fa. Hoffmann-La Roche A. G., Basel*.

* Entnommen einer Druckschrift der Hoffmann-La Roche A.G., Basel, die von dieser in Kürze an anderer Stelle veröffentlicht werden wird.

1. Im allgemeinen wird auf eine Ätherextraktion des Vitamins A aus organischem oder anorganischem Trägermilieu verzichtet, sofern der Vitamin A-Gehalt der zu untersuchenden Probe nicht unter 20 I.E./g des festen Analysenmaterials liegt. Ist er kleiner (Vitamin A < 20 I.E./g), empfiehlt sich eine Ätherextraktion des homogenisierten Musters in der Soxhletapparatur oder im verbesserten Extraktionsgerät nach TWISSELMANN.

Eine Sonderstellung nehmen hier alle künstlich vitaminierten Lebens- und Futtermittel ein, deren Vitamin A-Gehalt über Erzeugnisse der Philips-Roxane-Werke (z. B. Dohyfral Extra A-25) eingestellt wurden, weil hier vorangehende Ätherextraktionen ohnehin nicht zum Ziele führen. Diese Präparate müssen unter allen Umständen vorher einen alkalischen Aufschluß erfahren, um eine quantitative Extraktion des Vitamins A und damit seine verläßliche Bestimmung zu gewährleisten.

2. Die alkalische Verseifung des homogenisierten Analysenmaterials bzw. der daraus unter Umständen hergestellten Ätherextrakte mit kleinen alkoholischen Hydrochinonzusätzen erfolgt mit alkoholischer KOH-Lösung in offener Kristallisierschale bei beiläufig 80° C Wasserbadtemperatur unter gleichzeitigem Eindampfen der Seifenlösung bis zur Sirupkonsistenz, wobei die Verseifungszeit im allgemeinen 15—20 min betragen wird. Bei der Untersuchung von Butter- und Margarineproben empfiehlt sich eine Verseifungszeit von mindestens 30 min, wobei der verdampfende Alkohol 1—2mal ersetzt werden sollte.

3. Fettarmen Materialien werden vor der Verseifung 1—2 ml vitamin-A-freies Olivenöl zugesetzt, um Gehaltsverluste beim nachfolgenden alkalischen Aufschluß zu vermeiden. Der schonende Einfluß von vitamin-A-freiem Öl auf das Vitamin A bei alkalischer Verseifung fettarmer Materialien ist als Erfahrung aus vielfachen Versuchsreihen zu werten, ohne daß hierfür greifbare Erklärungen gegeben werden können.

4. Bei der Adsorption des sirupartigen Verseifungsproduktes an Aluminiumoxyd definierten Aktivitätsgrades wird der restliche Äthylalkohol im Wasserbad vertrieben und das Adsorbat bis zur Pulverform verrieben.

5. Während die zu guten Ergebnissen führenden Anregungen der Hoffmann-La Roche-Laboratorien jetzt eine Ätherextraktion des pulverförmigen Adsorbates in der Zentrifuge mit nachfolgender Wasserwäsche des Äthers vorsehen, wonach der Äther vertrieben und der Rückstand in vorbereitetem Chloroform aufgenommen wird, kommen wir auf kürzerem Wege sehr gut zum Ziel. Eine direkte Extraktion des Vitamins A aus dem pulverförmigen Adsorbat kann quantitativ mit 20—30 ml Chloroform erreicht werden, wenn ersteres in weithalsige Chromatographieröhren gefüllt und mit Chloroform eluiert wird.

6. In 2 ml des so anfallenden Vitamin A-Extraktes in Chloroform wird ohne weitere Reinigung (siehe 8) mit $FeCl_3$-Salzsäure-Acetylchloridreagens (= Reagens F6) im diphasischen System die Farbreaktion des

Vitamins A mit $FeCl_3$ durchgeführt. Die Extinktionsermittlung erfolgt stufenphotometrisch bei Spektralfilter S 61 in der Kleinküvette ($d = 1$ cm) im Pulfrich-Photometer, wobei die erreichten Extinktionen innerhalb der ersten 2 min nach Reaktionsbeginn einen nur unwesentlichen Abfall zeigen, der sich innerhalb der Ablesegenauigkeit bewegt und daher nicht berücksichtigt zu werden braucht. Er beträgt nämlich maximal innerhalb der ersten 2 min nach Reaktionsbeginn 3—5%. Es empfiehlt sich, bei $E > 0{,}7$ die vitamin A-haltige Chloroformlösung weiter zu verdünnen*, weil erstens die Ablesegenauigkeit bei $E > 0{,}7$ mit größeren Fehlern verbunden ist, zweitens die Extinktions-Konzentrationskurve des Vitamin A-$FeCl_3$-Komplexes in dem darüberliegenden Extinktionsbereich nicht unter allen Umständen linear ist. Die Extinktionsermittlung sollte immer in 2 verschiedenen Konzentrationen vorgenommen werden, wobei die Messungen zu einander entsprechenden Ergebnissen führen müssen.

7. Aus der abgelesenen Extinktion kann über eine Eichkurve (Extinktions-Konzentrationskurve) der Vitamin A-Gehalt der Einwaage sehr einfach rückgerechnet werden.

8. Eine chromatographische Reinigung der hier anfallenden vitamin A-haltigen Lösungen von störenden Begleitstoffen, in erster Linie gefärbten Verbindungen, hat sich bei der Aufarbeitung der später unter Punkt 10 näher aufgeführten biologischen Substanzen im allgemeinen nicht als notwendig erwiesen. Etwa mit dem Vitamin A vergesellschaftetes Carotin stört erfahrungsgemäß die Bestimmung von Vitamin A über seinen $FeCl_3$-Komplex nicht, sofern der gemessene Gelbwert des Carotins der chloroformischen Endlösung kleiner als $E = 0.6$ ist, was meist der Fall sein wird. ($E = 0{,}6$; $d = 1$ cm bei S 47 entspricht etwa 2,5 μg β-Carotin.)

Theoretisch muß natürlich die von der Carr-Price-Reaktion her bekannte Extinktionskorrektur des Vitamin A-Metallhalogenid-Farbkomplexes bei Anwesenheit von ebenfalls reagierenden Carotinanteilen vorgenommen werden. Hieran ändert auch nichts die Verwendung neuer Reagenzien wie hier in Form des Eisen(III)-chlorides. Die praktische Vitamin A-Analytik jedoch kann unseres Erachtens auf derartige Korrekturen verzichten, wenn nicht besondere Verhältnisse vorliegen. Dies ist z. B. der Fall bei A-vitaminierten Kraftfuttergemischen, die häufig größere Grünmehlanteile als Carotinträger neben synthetischem Vitamin A führen, oder bei besonders carotinreichen Milchen oder bei gewissen tierischen Organen (Ovarien). Der Verzicht auf die Korrekturen gilt sowohl für die bisherige Carr-Price-Reaktion als auch für die hier vorgeschlagene Farbreaktion des Vitamins A mit $FeCl_3$, weil derartige Extinktionskorrekturen erfahrungsgemäß innerhalb der mit dem Auge

* Verwendete Reagenzien: siehe 5a.

erreichbaren Ablesegenauigkeit am Meßgerät, zumindest aber innerhalb der analytischen Fehlergrenze von $\pm 6\%$ liegen und somit nur theoretisches Interesse besitzen. Die niedrigen Korrekturwerte erklären sich aus dem großen Unterschied der molaren Extinktionskoeffizienten der Farbkomplexe des Vitamins A und des Carotins. Die Koeffizienten wurden von uns mit Reagens F 6 im diphasischen System bei Spektralfilter S 61 in der folgenden Höhe wiederholt ermittelt:

Farbkomplex des Vitamins A: $\varepsilon = 72000$ Mol Lit. $^{-1}$ cm $^{-1}$ $\mp 6\%$,
Farbkomplex des Carotins: $\varepsilon = 16000$ Mol Lit. $^{-1}$ cm $^{-1}$ $\mp 6\%$.

Das Verhältnis verschiebt sich nochmals um den Faktor 2 zugunsten des Vitamins A wegen des, verglichen mit Vitamin A, doppelt so hohen Molekulargewichtes des β-Carotins. Prinzipiell bestehen jedoch gegen eine Korrektur der Vitamin A-Extinktion, wie sie bei der Carr-Price-Reaktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von β-Carotin gehandhabt wird, über eine Blauwertkurve des Carotins keine Bedenken.

Schließlich bleibt es dem Untersuchenden überlassen, die chromatographische Abtrennung des β-Carotins von Vitamin A an Aluminiumoxyd definierten Aktivitätsgrades vorzunehmen, wie sie von P. B. Müller[4] und Wodsak[5] vorgeschlagen wurde und mit gutem Erfolg angewendet werden kann.

9. Über die Größenordnung etwa auftretender Vitamin A-Verluste im Verlauf des Analysenganges gibt ein Parallelversuch Aufschluß, der am gleichen Material mit einem bekannten Vitamin A-Zusatz in Olivenöl in sonst gleicher Weise durchgeführt wird.

10. Die hier gebrachten Vorschläge wurden lange Zeit mit den bisher allgemein üblichen Arbeitsvorschriften zur Vitamin A-Bestimmung mit anschließender Carr-Price-Reaktion verglichen und führten bei der Aufbereitung folgender vitamin A-haltiger Präparationen zu verläßlichen Ergebnissen: Lebertrane verschiedener Provenienz, Lebertranemulsionen, Lebertraneiweißpasten, Lebertran-Milchalbuminkonzentrate, ölige Vitamin A-Konzentrate, Vitamin A-Konzentrate in Pulverform, A-vitaminierte Mineralstoffmischungen mit Spurenelementzusätzen, A-vitaminierte Fischmehle, A-vitaminierte Getreidemehle und andere vitaminierte Kraftfuttermittel.

Bei der Untersuchung tierischer Organe haben sich diese Vorschläge besonders bewährt bei der Bestimmung des Vitamin A-Gehaltes in Rinder-, Schweine-, Ratten- und Fischleber, ebenso bei der Untersuchung von Rinder- und Schweineovarien. Im letzten Falle wurde das im Vergleich zu Vitamin A in sehr großer Menge vorkommende β-Carotin chromatographisch nach den Vorschlägen von P. B. Müller[4] und Wodsak[5] abgetrennt.

Mit kleinen Abänderungen ist diese Versuchsanordnung anwendbar bei der Vitamin A-Untersuchung von Butter und A-vitaminierter Margarine. Nur wird man wegen des relativ geringen Vitamin A-Gehaltes dieser Substanzen je Gramm Einwaage in Punkt 5 die Extraktion des anfallenden, pulverförmigen Verseifungsproduktes nicht, wie dort angegeben, mit Chloroform vornehmen, weil hierdurch eine zu große Verdünnung der nur spärlich vorhandenen Vitamin A-Mengen einträte. Hier empfiehlt sich vielmehr eine Extraktion im Chromatographierohr mit 30—40 ml Diäthyläther, der anschließend im Vakuum quantitativ (!!) abdestilliert wird. Der Rückstand wird in 5—10 ml Chloroform gelöst*, worauf man entsprechend Punkt 6 weiter verfährt.

Weitere Abänderungen der obigen Anregungen werden notwendig, wenn es sich um Vitamin A-Bestimmungen in stark wasserhaltigen Substanzen (Milch, Blut, vorwiegend wäßrige Vitamin A-Emulsionen) handelt, weil die Verseifung derartiger Produkte in einer offenen Kristallisierschale bei 80° C eine Verdunstung der eingebrachten Wasseranteile nicht zuläßt. Hier kommt man in vielen Fällen zum Ziel, wenn man im Schütteltrichter eine 3—4malige Diäthylätherextraktion dieser Stoffe vornimmt, die vereinigten Ätherextrakte im Vakuum unter Zusatz einiger Hydrochinonkristalle einengt und unter Beachten des Punktes 3 dann die Verseifung wie oben angegeben durchführt.

Ob in der Verwendung der hier für die Milch und andere stark wasserhaltige Substanzen angegebenen Vorschläge wesentliche technische Erleichterungen und Vorteile gegenüber der bisher vielfach bewährten direkten „Kalt"- oder „Heißverseifung" zu sehen sind, mag dahingestellt bleiben.

Das Problem der Vitamin A-Bestimmung im Blutplasma oder Serum, das in der Forderung gipfelt, hier von kleinsten Blutmengen, wie sie etwa durch Lanzettenstich entnommen werden können, auszugehen, wird ohnehin weiterer experimenteller Überarbeitung bedürfen, da unseres Wissens die von Bessey u. Mitarb.[1] 1947 veröffentlichten Resultate, die aus 0,01—0,2 ml Blut menschlicher Patienten gewonnen werden, bisher von anderen Autoren nicht reproduziert wurden, wobei auch hier noch prinzipielle methodische Bedenken bestehen.

b) Verwandte Reagenzien:

1—4. *Salzsaure-$FeCl_3$-Lösung. Acetylchlorid (p. a.). Reagens F 6, Essigsäureanhydrid (p. a.)* sind in Mitteilung III näher beschrieben.

5. *Chloroform DAB 6.* Ein Volumteil Chloroform DAB 6 wird dreimal mit einem gleichem Volumteil dest. Wasser zur Entfernung des bei längerer Lagerung als Konservierungsmittel dienenden Alkoholzusatzes gewaschen und in einer *Schliff*-apparatur im Wasserbad destilliert. Hierbei werden die erste und letzte Fraktion (jeweils 5 -10% des Gesamtvolumens) für die Weiterverwendung ausgeschlossen.

* Verwendete Reagenzien: siehe 5a.

So vorbehandeltes Chloroform wird über frisch geglühtem Aluminiumoxyd nach Brockmann (etwa 30 g l Chloroform) unter Lichtabschluß nach Möglichkeit im Eisschrank aufbewahrt und ist erfahrungsgemäß viele Wochen haltbar, sofern man hin und wieder kräftig durchschüttelt. Kleinere Mengen Chloroform (bis 250 ml) lassen sich *ohne* vorherige Destillation vorbereiten, wenn man die gewaschene und über Natriumsulfat vorgetrocknete Menge über eine 6—8 cm hohe Säule von frisch geglühtem Aluminiumoxyd* nach Brockmann etwa in der Chromatographieröhre (∅ 2 cm) laufen läßt. Vor der weiteren Verwendung für analytische Zwecke wird das Chloroform sorgfältig vom hochaktiven Aluminiumoxyd abfiltriert, weil selbst Spuren davon zerstörenden Einfluß auf die Vitamine A und D ausüben.

5a. Prinzipiell erfordert die Bestimmung des Vitamins A mit Reagens F 6 als Reaktionsmedium ein Chloroform bestimmter Oberflächenspannung (siehe auch Mitteilung III). Diese Oberflächeneigenschaften werden sehr leicht und sicher reproduzierbar erreicht, wenn das völlig wasserfreie Chloroform (100—200 ml) eine 2 bis 3 cm hohe Schicht von desaktiviertem Aluminiumoxyd (Punkt 9a) in der Chromatographiesäule (∅ 2 cm) durchläuft, wobei es anscheinend zu einer geringfügigen Wasseraufnahme des Chloroforms kommt, das hiermit die günstigen Oberflächeneigenschaften erwirbt, wie sie für eine gewünschte Farbentwicklung des Vitamins A mit Reagens F 6 verlangt werden müssen.

Nur so vorbehandeltes Chloroform darf zu Vitamin A-Bestimmungen mit Reagens F 6 verwendet werden.

In praxi nimmt das Chloroform bei der Elution des an desaktiviertem Aluminiumoxyd (Punkt 9a) adsorbierten Verseifungsproduktes diese Eigenschaften an (Allgemeine Bemerkungen, Punkt 5). Man wird also im allgemeinen nur bei der weiteren Verdünnung des so gewonnenen chloroformischen Vitamin A-Extraktes, bei der Aufstellung von Eichkurven, oder wenn die Extraktion des pulverförmigen Verseifungsproduktes mit Diäthyläther vorgenommen wurde, auf die Bereitstellung des oben geforderten Chloroforms angewiesen sein.

6. Alkoholische KOH-Lösung. 5 g Kaliumhydroxyd (p. a.) werden auf 100 ml in 96%igen Alkohol gelöst. Bei bräunlicher Verfärbung der alkoholischen Kalilauge (Verharzung) ist sie von der weiteren Verwendung auszuscheiden.

7. *Alkoholische Hydrochinonlösung.* 1 g Hydrochinon (p. a. oder puriss.) wird auf 9 ml in 96%igem Alkohol gelöst. Diese Lösung ist im allgemeinen nur 24 Std haltbar.

8. *Diäthyläther* (siehe auch Allgemeine Bemerkungen, Punkt 1). 1 Volumteil Diäthyläther DAB 6 wird dreimal mit gleichen Volumteilen dest. Wasser gewaschen und im elektrisch geheizten Wasserbad destilliert. Das Destillat kann über einer 5%igen Eisen(II)-sulfatlösung lange Zeit unzersetzt aufbewahrt werden. (Eventuelle Prüfung auf Peroxyde mit der Kaliumjodid-Stärkereaktion.) Vor jeder Ätherentnahme wird gut aufgeschüttelt und die Schichtentrennung abgewartet. Man trocknet die entnommene Ätherprobe zweckmäßig vor der weiteren Verwendung kurz über geglühtem Natriumsulfat.

9. *Aluminiumoxyd nach* Brockmann (Merck) wird 6 Std bei 4—600° C im Muffelofen gehalten und dabei maximal aktiviert. Unter Ausschluß von Feuchtigkeit wird es im Exsiccator abgekühlt. Es kann dann in trockenen verschlossenen Schliffflaschen längere Zeit aufbewahrt werden. Über derartigem aktiviertem Aluminiumoxyd ist alkoholfreies Chloroform fast unbeschränkt lagerfähig.

9a. Zur Adsorption des Seifensirups oder zur Erstellung des unter Punkt 5a bezeichneten Chloroforms mißt man 30 ml des maximal aktivierten Al_2O_3 in eine Mensur, die durch Schliff verschlossen sein sollte, pipettiert 2 ml dest. Wasser hinzu und schüttelt kräftig, bis alle Klümpchen restlos zerfallen sind.

* Vgl. Punkt 9.

10. *Besondere Geräte.* Kristallisierschalen ⌀ 6—7 cm. — Etwa 6 cm hohe Entwicklerschalen, die sich bei Reihenuntersuchungen gut als Wasserbad eignen. — Chromatographieröhren von 18—20 cm Länge, ⌀ 2 cm mit Schliff (NS 29), dazu geeignete Zwischenstücke und Auffangmensuren. — Mikromeßpipetten (0,1 ml).

c) Untersuchungsbeispiel.

Vitamin A-Bestimmung in einer Rattenleber.

1—3 g Rattenleber werden mit dem Skalpell möglichst fein zerschnitten und in eine Kristallisierschale übergeführt, unter Zusatz von 1 ml Hydrochinonlösung und 10—15 ml alkoholischer KOH-Lösung wird im Wasserbad bei 80° C gegebenenfalls unter weiterem Zusatz von 10 ml Alkohol so lange verseift, bis nach 20 min ein sirupartiges Verseifungsprodukt vorliegt.

8 ml des unter 9a bezeichneten Aluminiumoxyds werden in die Kristallisierschale gegossen und das Verseifungsprodukt hieran adsorbiert. In weiteren 5 bis 10 min verdunstet unter mehrmaligem Umrühren und Durchkneten mit einem Spatel der Alkohol restlos; es hinterbleibt ein feinpulverförmiges Verseifungsadsorbat.

Inzwischen wird eine Chromatographieröhre unten mit einem Wattebausch verschlossen und eine 2—3 cm hohe Schicht von desaktiviertem Al_2O_3 eingebracht. Hierauf wird das pulverförmige, braun gefärbte Adsorbat des Verseifungsproduktes quantitativ geschichtet. Die Elution des Vitamins A erfolgt nun mit dem unter Punkt 5 bezeichneten Chloroform. Im allgemeinen ist die Elution quantitativ durchgeführt, wenn 20—30 ml Chloroform die Säule passiert haben und in der Vorlage erscheinen. Der chloroformische Vitamin A-Extrakt ist in der Regel farblos oder schwach gelblich. In seltenen Fällen ist es zum Auswaschen eines braunen Farbstoffes aus der Säule gekommen. Durch eine nochmalige Passage einer 2—3 cm hohen Schicht von desaktiviertem Aluminiumoxyd gelingt es leicht, die störende Begleitfarbe des Vitamin A-Extraktes zu entfernen und einen aliquoten Teil des nun farblosen Extraktes mit Reagens F 6 zur Messung zu bringen. Für die Durchführung der Farbreaktion verweisen wir auf unsere Ausführungen in der Mitteilung III.

Der Vitamin A-Gehalt der eingewogenen Probe kann leicht über die im Stufenphotometer abgelesenen Extinktionswerte unter Benutzung einer Eichkurve berechnet werden (vgl. Mitteilung III).

Der deutschen Forschungsgemeinschaft haben wir für die sächliche Unterstützung der Arbeit bestens zu danken.

Weiterhin danken wir Frl. O. Wurmbach für die Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen.

Literatur.

[1] Bessey, O., O. H. Lowry, M. J. Brock u. J. A. Lopez: J. biol. Chemistry **165**, 177 (1946). — [2] Brüggemann, J., W. Krauss u. J. Tiews: Mitteilung I. Diese Z. **135**, 241—250 (1952). — Mitteilung II. Diese Z. **137**, 421—433 (1953). — Mitteilung III. Diese Z. **141**, 161—173 (1954). — [3] Fuchs, L., u. E. Soos: Vitamine u. Hormone **4**, 155 (1943). — [4] Müller, P. B.: Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. (Bern) **40**, 369 (1949). — [5] Wodsak, W.: Pharmazie **5**, 520—524 (1950).

Prof. Dr. Dr. J. Brüggemann, München, Veterinärstr. 6.

Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg.

Zur Bestimmung von Phenolen mit 2,4-Dinitrofluorbenzol.

II. Mitteilung.

Spaltung von Dinitrophenyläthern durch Amine.

Von

H. Zahn und R. Kockläuner*.

(Eingegangen am 30. November 1953.)

2,4-Dinitrophenyläther werden beim Erhitzen mit Aminosäuren und Aminen aminolytisch in Phenol und 2,4-Dinitrophenylamin zerlegt. Für die Wiedergewinnung des Phenols aus seinem Dinitrophenyläther eignet sich die Aminolyse mit Hexamethylendiamin.

A. Spaltung mit Hexamethylendiamin.

In einer früheren Veröffentlichung[10] wurde die Dinitrophenylierung von Phenolen mit 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB) bei Zimmertemperatur beschrieben, wobei in nahezu quantitativen Ausbeuten Dinitrophenyl-(DNP-)Äther erhalten wurden. Diese DNP-Äther sind kristallin, schmelzen scharf und können zur Isolierung der Phenole herangezogen werden.

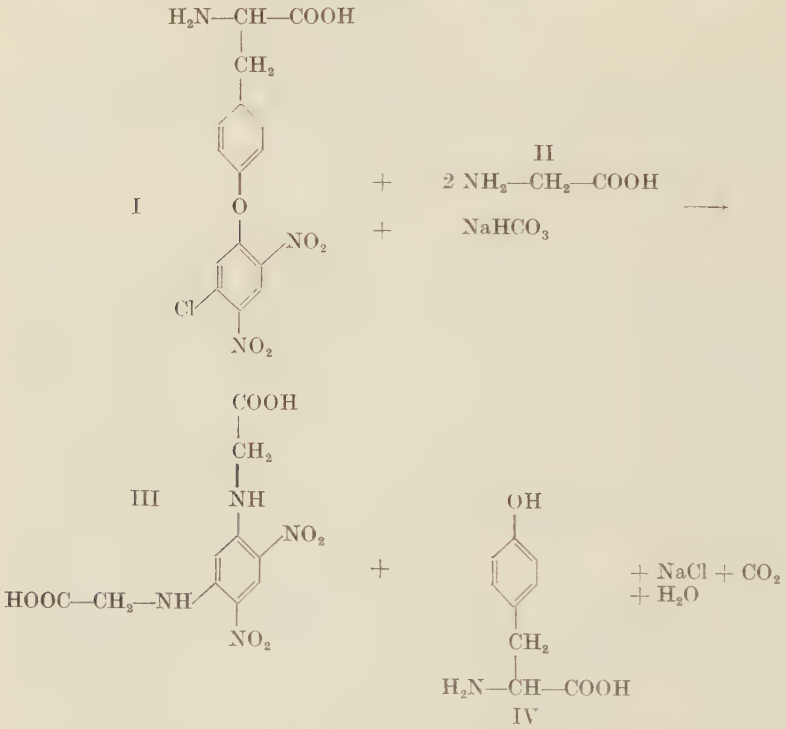
Offengelassen wurde die Frage, wie man die Phenole aus ihren DNP-Äthern wieder freisetzen kann. Bekanntlich sind 2,4-Dinitrophenyläther gegen Säuren, z. B. halbkonzentrierte Salzsäure, bei 105° C sehr beständig. Das für bestimmte eiweißchemische Fragen wichtige O-DNP-Tyrosin wird bei der üblichen Proteinhydrolyse zu weniger als 5% gespalten. Eine Spaltung der DNP-Äther durch Alkalien ist möglich und wurde von uns beim DNP-Phenol[10] durchgeführt. Diese Spaltung ist jedoch zur Wiedergewinnung empfindlicher Phenole weniger geeignet. Günstiger ist die insbesondere von Borsche[1, 5] beschriebene Spaltung von DNP-Äthern durch verschiedene Stickstoffbasen wie Hydroxylamin, Ammoniak, Anilin und Phenylhydrazin.

Bei dem Versuch O-(2,4-Dinitro-5-chlorphenyl)-tyrosin (I) mit Glykokoll (II) durch Reaktion in der Hitze in das gewünschte O-(2,4-Dinitro-5-carboxymethylenaminophenyl)-tyrosin zu überführen, wurde zu unserer Überraschung N,N′-(2,4-Dinitro-1,5-phenylen)-bis-glycin (III) und freies Tyrosin (IV) erhalten.

Die DNP-Ätherbindung war demnach von der Aminosäure aminolytisch gespalten worden. Diese Beobachtung, die an anderem Orte im

* Aus der Dissertation R. Kockläuner, Heidelberg 1953.

einzelnen belegt wird[8], führte zu Versuchen, allgemein aus DNP-Äthern das Phenol durch Behandlung mit Aminosäuren und Aminen freizusetzen. Bei Spaltung mit Aminosäuren wurden für die Isolierung des Phenols ungünstige Löslichkeitsverhältnisse angetroffen, da Phenol und DNP-Aminosäuren ätherlöslich sind. Es war naheliegend, die Spaltung mit Diaminen zu versuchen, um in dem zu erwartenden Mono-DNP-diamin die DNP-Gruppe in einer Verbindung festzulegen, welche im sauren Milieu in der wäßrigen Phase als Hydrochlorid verbleibt, so daß das Phenol leicht in reiner Form durch Ausäthern erhalten werden kann.



Als Diamin eignet sich z. B. Hexamethylendiamin, dessen Bis-DNP-derivat in den gebräuchlichen Lösungsmitteln unlöslich ist. Das Phenol läßt sich aus der angesäuerten Reaktionslösung in einfacher Weise durch Extraktion mit Äther entfernen, wobei überschüssiges Hexamethylendiamin und gebildetes Mono-DNP-hexamethylendiamin[8] als Hydrochloride in der wäßrigen Lösung bleiben[9].

Die Reaktion wurde mit 2,4-Dinitrodiphenyläther (DNP-Phenol) in wäßrig-alkoholischer Lösung durch Kochen unter Rückfluß (t = 80 bis 85° C, 65 min, p_H 8,6) durchgeführt und das Phenol als Tribromphenol bestimmt. Versuche, die im gleichen oder größeren Maßstabe, über die

gleiche und doppelte Zeit und mit der doppelten und dreifachen Menge Hexamethylendiamin durchgeführt wurden, ergaben nur geringe Schwankungen in der Ausbeute an Tribromphenol (80% d. Th.).

Eine Anwendung dieser Reaktion in der Ligninchemie wurde inzwischen von Freudenberg und Rasenack beschrieben[6].

B. Spaltungen mit Aminosäuren.

Mit *Glykokoll* wurden aus DNP-*Phenol* beim Kochen unter Rückfluß in wäßrig-alkoholischer Lösung statt des reinen DNP-Glycins Additionsprodukte erhalten, die beim Ansäuern ausfielen, zwischen 260 und 280° C schmolzen, gut kristallisierten, hellgelb bis graubraun gefärbt und wesentlich schwerer löslich als DNP-Glycin waren. Diese Produkte ließen sich durch Lösen in Äther, anschließendes Verdampfen des Lösungsmittels und Trocknen des Rückstandes i. v. bei 100° C zersetzen und enthielten etwa 82% DNP-Glycin. Die Gesamtausbeute nach 100 min langem Kochen betrug etwa 67%.

Dinitrophenetol reagiert mit Glykokoll undurchsichtig. Es fiel nach Ansäuern und Verdampfen des Alkohols ein Produkt aus, das sich nur zum Teil in Äther löste. Aus der ätherischen Lösung wurde nach Verdampfen des Lösungsmittels zu 32% d. Th. DNP-Glycin erhalten. Der Rückstand war außer in Äther in Alkohol, Wasser, Amylalkohol und Dimethylformamid unlöslich. Nach mehrfachem Umfällen durch Lösen in verdünntem Ammoniak und Ausfällen mit verdünnter Salzsäure wurde ein Produkt unbekannter Konstitution vom Zersetzungspunkt 260° C erhalten. Wegen der geringen Löslichkeit ließ sich eine Molekulargewichtsbestimmung nicht durchführen.

	Analyse	%	Atomverhältnis
	C	46,52	3,87
	H	2,87	2,85
	N	12,84	0,92
durch Differenz	O	37,76	2,36

Das Atomverhältnis entspricht etwa Verbindungen der Zusammensetzung $C_8H_6O_5N_2$ oder $C_{17}H_{12}O_{10}N_4$.

Aus *Tri*-DNP-*Gallussäure* und Glycin wurden durch Kochen unter Rückfluß nach 40 min 65% d. Th. DNP-Glycin erhalten.

Die Spaltungen mit *Valin* verlaufen glatter als die mit Glycin, da keine Additionsprodukte gebildet werden. DNP-Phenol lieferte nach 2stündigem Kochen mit Valin unter Rückfluß 93,5% d. Th. DNP-Valin; das sehr stabile *Dinitroanisol*[7] wurde unter gleichen Bedingungen zu etwa 60% gespalten.

Bei der Spaltung von DNP-*Phenol* mit *Lysin* wurde vorwiegend ε-DNP-Lysin gebildet, das isoliert wurde. Ebenso bildet sich mit Oxylysin ε-DNP-Oxylysin.

2,4-Dinitrodiphenylsulfid (DNP-Thiophenol), das bereits aus DNClB und Thiophenol dargestellt worden war, wurde mit DNFB analog der für die Herstellung von DNP-Äthern angegebenen Methode[10] gewonnen und mit Valin umgesetzt. Die Spaltung betrug nur etwa 25%, war also viel geringer als bei Sauerstoffäthern. In saurer Lösung wurde DNP-Valin nur in Spuren gebildet.

C. Beschreibung der Versuche.

1. Spaltung von 2,4-Dinitrophenylphenol mit Hexamethylendiamin.

232 mg Hexamethylendiamin (2 mMol) wurden in 12 ml Wasser gelöst und 36 ml Alkohol und 520 mg (2 mMol) 2,4-Dinitrophenyläther (Fp 70° C) hinzugefügt. Die Mischung wurde schnell erwärmt, wobei das DNP-Phenol in Lösung ging und das Einsetzen der Reaktion durch Gelbfärbung angezeigt wurde, und noch weitere 65 min lang unter Rückfluß gekocht. Die Reaktionstemperatur betrug 82° C, der p_H-Wert der Lösung nach Beendigung der Reaktion 8,6. Während der Reaktion fiel langsam gelbes Bis-DNP-hexamethylendiamin aus, das abfiltriert wurde, nachdem die Lösung schnell unter fließendem Wasser abgekühlt worden war [224 mg, (Fp 203° C) = 50% der Dinitrophenylgruppen]. Nach dem Ansäuern wurde der Alkohol abgedampft und die durch Phenol und Mono-DNP-hexamethylendiamin getrübte wäßrige Lösung zweimal mit Äther ausgezogen. Die gelben Ätherauszüge wurden vereinigt und zur Beseitigung von Mono-DNP-hexamethylendiamin dreimal mit 2 n Salzsäure ausgewaschen, die Salzsäure zu der wäßrigen Ausgangslösung gegeben und diese noch ein drittes Mal ausgeäthert, wobei der Ätherextrakt wie oben behandelt und mit den ersten Auszügen vereinigt wurde. Dieser schwach gelbgrün gefärbte Auszug wurde mehrfach mit wenig Natronlauge ausgeschüttelt, wobei sich die wäßrig-alkalische Phase infolge geringer Spuren Dinitrophenol gelbgrün färbte, während die ätherische Schicht ihre Farbe behielt. Die Tatsache, daß die alkalische Lösung beim Ansäuern farblos wird, beweist, daß es sich nur um geringe Spuren von Dinitrophenol handeln kann. Diese Lösung wurde mit Natriumhydrogencarbonat auf etwa p_H 6—7 eingestellt und die bei diesem p_H-Wert gelblichgrüne Lösung mit Bromwasser versetzt. Da das entstandene Produkt wegen eines Gehaltes an Tribromphenolbrom erst bei 114° C schmolz, wurde es in Alkohol gelöst, die alkoholische Lösung in der Hitze eingeengt und daraus mit Wasser Tribromphenol gefällt[3]. Die Ausbeute an reinem Tribromphenol (Fp 95° C) betrug 537 mg = 81% d. Th.

2. 2,4-Dinitrophenylglycin aus 2,4-Dinitrophenylphenol und Glycin.

300 mg Glycin (4 mMol) und 420 mg Natriumhydrogencarbonat (5 mMol) wurden in 12 ml Wasser gelöst, 36 ml Alkohol und 260 mg DNP-Phenol (1 mMol) zugegeben, das sich bis auf einen geringen Rest löste. Die Lösung, die sich bald gelb färbte, wurde 100 min lang unter Rückfluß gekocht, noch heiß angesäuert und der Alkohol sofort verdampft. Beim Erkalten fiel ein gelber kristalliner Niederschlag aus, der abfiltriert, mit Wasser und etwas Äther gewaschen und getrocknet wurde (197 mg). Die Substanz wurde zwischen 192 und 195° C feucht und schmolz scharf bei 260° C unter Zersetzung.

In einigen Fällen wurden Produkte erhalten, die scharf bei 271° C unter Zersetzung schmolzen. Der Versuch, eine solche Substanz durch Lösen in 1%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und Ansäuern zu reinigen, führte zu einem um 7° C tiefer schmelzenden Produkt (Fp 264° C). Dagegen schmolz der beim Extrahieren mit Äther erhaltene Rückstand 9° C höher.

Die Extraktion der wäßrigen Lösung lieferte nur noch wenige mg DNP-Glycin. Das oben erhaltene hellgelbe Reaktionsprodukt wurde in 310* ml Äther gelöst und dieser verdampft. Der Rückstand wurde etwa 30 min im siedenden Wasserbad i. v. getrocknet und ergab 162 mg DNP-Glycin (Zers. 196° C, 67,3% d. Th.). Das Rohprodukt enthielt somit zu 17,7% einen flüchtigen Stoff.

3. 2,4-Dinitrophenylglycin aus 2,4-Dinitrophenetol und Glycin.

Zu der wie oben bereiteten Lösung von 300 mg Glykokoll und 420 mg Natriumhydrogencarbonat in 7,5 ml Wasser und 22,5 ml Alkohol wurden 212 mg Dinitrophenetol (1 mMol) gegeben. Die Lösung wurde bei p_H 9,3 120 min unter Rückfluß gekocht und noch warm auf p_H 6 angesäuert. Am nächsten Morgen waren Kristalle ausgefallen, worauf der Alkohol vorsichtig auf dem Wasserbad verdampft wurde. Nach dem Erkalten wurde ein hellgelbes Produkt abfiltriert (177 mg), das bei 195° C feucht wurde und bei 220° C schmolz. Durch Ausziehen mit Äther ließ sich nur ein Teil abtrennen, aus dem nach Verdampfen des Äthers 89 mg (31% d. Th.) DNP-Glycin erhalten wurden. Der Rückstand wurde dreimal durch Lösen in verdünntem Ammoniak und Ansäuern mit Salzsäure umgefällt. Das kristalline weißgelbe Produkt zersetzte sich bei 260° C.

4. 2,4-Dinitrophenylglycin aus Tri-DNP-gallussäure und Glycin.

334 mg Tri-DNP-gallussäure ($^1/_2$ mMol) und 672 mg Natriumhydrogencarbonat (8 mMol) wurden mit 50 ml Wasser übergossen, 450 mg Glycin (6 mMol) hinzugefügt und erhitzt. Die Lösung färbte sich schon bei Zimmertemperatur gelb. Nach 30 min langem Kochen war alles gelöst, nach weiteren 10 min wurde die braunrote Lösung angesäuert. Am nächsten Tage wurden 234 mg dunkelbraunes DNP-Glycin (Fp 200° C, 65% d. Th.) abfiltriert, aus dem durch einfaches Umkristallisieren mit Kohle gelbes DNP-Glycin (Zers. 205° C) erhalten wurde.

Die wäßrige Lösung lieferte nach Abtrennung der Gallussäure durch Schütteln mit essigsaurer Bleiacetatlösung etwas Dinitrophenol.

5. 2,4-Dinitrophenylvalin aus DNP-Phenol und Valin.

Die wie unter 2 hergestellte Lösung von 520 mg DNP-Phenol (2 mMol), 936 mg D, L-Valin (8 mMol) und 840 mg Natriumhydrogencarbonat (10 mMol) in 67,5 ml Alkohol und 22,5 ml Wasser wurde 2 Std unter Rückfluß gekocht und angesäuert. Am nächsten Morgen hatten sich Kristalle abgeschieden, von denen abdekantiert wurde. Die überstehende alkoholische Lösung wurde eingedampft und mit Kristallen angeimpft. Das DNP-Valin wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Fp 185° C (Lit. 185° C[1]); 530 mg = 93,5% d. Th.

6. 2,4-Dinitrophenylvalin aus 2,4-Dinitroanisol und Valin.

Die wie oben bereitete Lösung von 119 mg Dinitroanisol (0,6 mMol), 281 mg D, L-Valin (2,4 mMol) und 252 mg Natriumhydrogencarbonat (3 mMol) in 22,5 ml

* Zum Lösen von reinem DNP-Glycin hätte wesentlich weniger Äther genügt.

Alkohol und 7,5 ml Wasser wurde 130 min lang unter Rückfluß gekocht und, auf p_H 6 angesäuert, der Alkohol verdampft. Die ausgefallenen Kristalle wurden abfiltriert (Fp 170° C, 63 mg).

Durch Ausäthern der wäßrigen Lösung und Verdampfen des Äthers, Aufnehmen des Sirups in Alkohol und Animpfen mit DNP-Valin wurden noch 58 mg Substanz vom Fp 150° C erhalten. Beide Fraktionen wurden vereinigt, in Hydrogencarbonat gelöst, vom Dinitroanisol abfiltriert (Fp 89° C. Lit. 89° C[2]; 16 mg = 13%), dann angesäuert und erneut abfiltriert. Die Ausbeute betrug 85 mg DNP-Valin, Fp 170° C = 50% d. Th., Umsatz etwa 60%.

7. ε-DNP-Oxylysin aus DNP-Phenol und Oxylysin.

(Aus der Dissertation E. Umlauf, Heidelberg 1954.)

20 mg (0,1 m Mol) synth. Oxylysinmonohydrochlorid, 13 mg (0,05 m Mol) O-DNP-Phenol und 25 mg (0,3 m Mol) $NaHCO_3$ werden in 1,5 ml Wasser gelöst und anschließend 0,8 ml Äthanol zugefügt. Die klare, farblose Lösung wird 60 min am Rückfluß gekocht. Die nun gelb gefärbte Lösung wird rasch abgekühlt, mit verdünnter Salzsäure angesäuert und ausgeäthert. Laut papyrographischer Analyse [aufsteigende Technik in sec-Butanol (75), Ameisensäure (15) und Wasser (10)] ist das Hauptprodukt der Reaktion ε-DNP-Oxylysin mit einem R_f-Wert von 0,37. Der Fleck ist gelb, färbt sich mit Ninhydrin schmutzig braun und hat denselben R_f-Wert wie die aus DNP-Kollagen isolierte Verbindung (vgl. Dissertation R. Dietrich, Heidelberg 1953). Die extrahierte wäßrige Phase des Ansatzes enthielt außerdem reichlich Oxylysin (da als spaltende Aminosäure im Überschuß verwendet), R_f 0,02 und 3 Nebenprodukte mit den R_f-Werten 0,11, 0,22 (farblos, ninhydrinpositiv) und 0,45 (gelb).

8. 2,4-Dinitrophenylvalin aus 2,4-Dinitrophenylthiophenol und Valin.

184 mg DNP-Thiophenol ($^2/_3$ mMol), 312 mg D, L-Valin (^{3} mMol) und 280 mg Natriumhydrogencarbonat ($^{10}/_3$ mMol) in 22,5 ml Alkohol und 7,5 ml Wasser wurden 2 Std lang unter Rückfluß gekocht; am nächsten Morgen wurde das nicht umgesetzte DNP-Thiophenol abfiltriert (Fp 120° C, 110 mg = 60%). Dann wurde angesäuert, der Alkohol abgedampft und der ausgefallene Niederschlag nach dem Erkalten abfiltriert. Er wurde in Natriumhydrogencarbonatlösung zu lösen versucht, das ungelöste DNP-Thiophenol abfiltriert, die Lösung angesäuert und das ausgefallene DNP-Valin isoliert (Fp 179° C; Ausbeute 30 mg = 16%). In Abwesenheit von Natriumhydrogencarbonat, also in schwach saurer Lösung, wurden bei 6stündigem Kochen unter Rückfluß nur Spuren von DNP-Valin gebildet.

Literatur.

[1] Abderhalden, E., u. P. Blumberg: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **65**, 318 (1910). — [2] Abderhalden, E., u. W. Stix: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **129**, 143 (1923). — [3] Autenrieth, W., u. F. Beuttel: Arch. Pharmaz. **248**, 112 (1910). — [4] Borsche, W.: Ber. dtsch. chem. Ges. **56**, 1488 (1923). — [5] Borsche, W.: Ber. dtsch. chem. Ges. **56**, 1494 (1923). — [6] Freudenberg, K., u. D. Rasenack: Chem. Ber. **86**, 755 (1953). — [7] Ogata, Y., u. M. Okano: J. Amer. chem. Soc. **71**, 3211 (1949). — [8] Zahn, H., u. R. Kockläuner: in Vorbereitung. — [9] Zahn, H., R. Kockläuner, P. Rathgeber u. W. Gerstner: Makromolekulare Chem., im Druck. — [10] Zahn, H., u. A. Würz: diese Z. **134**, 183 (1951).

Prof. Dr.-Ing. H. Zahn, Heidelberg, Keplerstraße 55.

Aus dem Institut für Warenkunde der Universität Turin.

Über den Nachweis des Heliotropins in Vanillin-Heliotropinmischungen.

Von

Angelo Castiglioni und Giacomo Bionda.

(Eingegangen am 3. Dezember 1953.)

Zum Nachweis des Heliotropins (Piperonylaldehyd) in Gegenwart von Vanillin und Cumarin sind verschiedene Methoden vorgeschlagen worden. Für den Nachweis in Vanillenzucker empfehlen H. Schellbach und Fr. Bodinus[9] die Farbreaktion mit Resorcin in Gegenwart von Schwefelsäure. A. Labat[6] verwendet zur Analyse der Vanillin- und Heliotropinmischungen die Reaktion mit Gallussäure in Gegenwart von Schwefelsäure. Das Verfahren gibt nach C. B. Gnadinger[5] bei der Bestimmung des Heliotropins in den Vanillonen und in der Vanille von Tahiti befriedigende Resultate. A. Bernardi und M. Tartarini[1] weisen Vanillin und Heliotropin in Zuckerlösungen mit Dimethyldihydroresorcin nach. Zum Mikronachweis eignen sich nach M. Wagenaar[10] die charakteristischen Formen der durch Sublimation erhaltenen Vanillin- und Heliotropinkristalle und ihr Verhalten gegenüber Salpetersäure, Bromwasser und Jod-Jodidlösung. Nach E. Opfer-Schaum und M. Piristi[8] kann auch der Schmelzpunkt des Eutektikums Vanillin-Heliotropin zum Mikronachweis benutzt werden. Auch die Fluorescenz ist zur Identifizierung herangezogen worden (E. Ekmann und A. Samyschlayewa[4]). Schließlich sind Vanillin und Heliotropin von H. Brockmann und F. Volpers[2] mittels Säulenchromatographie und von A. Mamel und G. Lalement[7] mittels Papierchromatographie getrennt worden.

Da wir Gelegenheit hatten, uns bei Bestimmung des Cyclohexanons[3] mit 2,6-Dipiperylidencyclohexanon, dem Kondensationsprodukt des cyclischen Ketons mit Heliotropin in einem alkalischen Medium, zu beschäftigen, dachten wir an die Möglichkeit, diese Reaktion zum Nachweis von Heliotropin in Gegenwart von Vanillin zu verwenden. Tatsächlich gibt Vanillin unter den genannten Bedingungen mit Cyclohexanon keinen Niederschlag. Wegen der sehr geringen Löslichkeit des 2,6-Dipiperylidencyclohexanons in 50%igem wäßrigem Alkohol (etwa 0,007% bei 20° C)[3] stellt die Reaktion umgekehrt ein empfindliches Mittel zum Nachweis des Heliotropins dar. Nach den neu durchgeführten Versuchen gelingt es, noch 0,00005 g Heliotropin zu erfassen, womit die Reaktion die gleiche Empfindlichkeit erreicht, wie die Probe von Labat.

Ausführung. Man versetzt 0,1 ml der zu prüfenden Lösung mit 0,2 ml einer 10%igen Lösung von Cyclohexanon in 95%igem Alkohol und fügt 2 ml einer 10%igen wäßrigen Natriumlauge hinzu. Man schüttelt, erhitzt bis zum Siedebeginn und läßt abstehen. In Gegenwart von Heliotropin trübt sich die Flüssigkeit in etwa $^1/_4$ Std und wird milchig oder es scheidet sich geradezu ein Niederschlag ab. Zur Sicherstellung des Heliotropinnachweises kann man die Flüssigkeit filtrieren, den Niederschlag wiederholt mit Wasser waschen und das Filter trocknen. Wenn man dann einen Tropfen Schwefelsäure darauf fallen läßt, erscheint bei Gegenwart von Heliotropin die für 2,6-Dipiperylidencyclohexanon charakteristische tief violette Färbung.

In Gegenwart von Vanillin färbt sich die Flüssigkeit gelb bis rötlich, und es ist weniger leicht, die Trübung zu bemerken, wenn sie nicht sehr stark ist. Die Empfindlichkeitsgrenze liegt in diesem Falle bei 0,0001 g Heliotropin. Die Probe wird durch Fälschungsmittel des Vanillins[6], z. B. durch Cumarin nicht gestört ebenso nicht durch Salicylsäure, Acetylsalicylsäure oder Benzoesäure.

Literatur.

[1] Bernardi, A., u. M. Tartarini: Ann. Chim. applicata **16**, 132 (1926); vgl. diese Z. **71**, 209 (1927). — [2] Brockmann, H., u. F. Volpers: Ber. dtsch. chem. Ges. **80**, 77 (1947). — [3] Castiglioni, A., u. G. Bionda: diese Z. **141**, 38 (1954). — [4] Ekmann, E., u. A. Samyschlajewa: Riechstoffind. u. Kosmet. **8**, 221 (1933); durch C. A. **1934**, 1626. — [5] Gnadinger, C. B.: Ind. Engng. Chem. **18**, 588 (1926). — [6] Labat, A.: Bull. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux **57**, 259 (1919); durch C. A. **1920**, 1406. — [7] Mamel, A., u. G. Lalement: Ann. Falsificat. Fraudes **45**, 259 (1952). — [8] Opfer-Schaum, E., u. M. Piristi: Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. **87**, 65 (1944); durch C. A. **1947**, 7671. — [9] Schellbach, H., u. Fr. Bodinus: Z. Unters. Nahr. Genußm. **36**, 187 (1918); **40**, 34 (1920); durch C. A. **1920**, 1169; vgl. diese Z. **72**, 463 (1927). — [10] Wagenaar, M.: Mikrochemie (N. S.) **5**, 135 (1932); vgl. diese Z. **98**, 150 (1934).

Prof. A. Castiglioni, Institut für Warenkunde, piazza Arbarello 8, Turin, Italien.

Aus dem Zentrallaboratorium der Kali-Chemie A.G., Hannover.

Zur Bestimmung von Natriumcarbonat in Schwefelnatrium.

Von

Karl Ernst Stumpf.

(Eingegangen am 10. Dezember 1953.)

Vor einiger Zeit veröffentlichte W. Sack[3] in dieser Zeitschrift eine ausführliche kritische Arbeit über die Bestimmung der Haupt- und Nebenbestandteile von Schwefelnatrium.

Für die Bestimmung des Natriumcarbonatgehaltes schlägt Sack das schon von Calcott u. Mitarb.[2] angegebene Verfahren vor. Danach wird in einem aliquoten Teil der Lösung der Probe mit Bariumchlorid gefällt,

der abfiltrierte und ausgewaschene Niederschlag von Bariumcarbonat, -sulfit und -sulfat in überschüssiger, siedend heißer 0,5 n Salzsäure gelöst, die Lösung zur Entfernung von Kohlendioxyd und Schwefeldioxyd gekocht und nach dem Abkühlen mit 0,5 n Natronlauge bis zum Umschlag von Methylorange zurücktitriert. Von dem ermittelten Säureverbrauch wird die dem Sulfitgehalt äquivalente Säuremenge abgezogen: die verbleibende Säuremenge entspricht dann dem Natriumcarbonatgehalt.

Diese Carbonatbestimmung ist doppelt indirekt; denn der Sulfitgehalt wird aus der Differenz der jodometrischen Bestimmung der Summe von Sulfit und Thiosulfat sowie von Thiosulfat allein ermittelt und nun wieder zur indirekten Bestimmung des Carbonatgehaltes herangezogen.

Ähnliches gilt für die in Betriebslaboratorien vielfach übliche Carbonatbestimmung aus der Differenz der acidimetrischen Bestimmung der Summe von Sulfid und Carbonat (Titration gegen Methylorange) und der jodometrischen Sulfidbestimmung. Der Sulfidgehalt wird hierbei ebenfalls als Differenz aus der Titration der Summe von Sulfid, Sulfit und Thiosulfat einerseits und derjenigen der Summe von Sulfit und Thiosulfat nach Fällung und Abtrennung des Sulfids andererseits ermittelt. Bei der zunächst erforderlichen acidimetrischen Titration wird nun in der Nähe des Äquivalenzpunktes Schwefel abgeschieden nach:

$$2\,H_2S + Na_2SO_3 + 2\,HCl \rightarrow 3\,S + 2\,NaCl + 3\,H_2O.$$

Es wird also über die Umsetzung von Carbonat und Sulfid hinaus noch zusätzlich Säure verbraucht. Schließlich setzt dieses Verfahren voraus, daß die Probe kein Hydrogensulfid enthält.

Auch abgesehen von dieser letzten Fehlermöglichkeit bleibt eine derartige Differenzbestimmung sehr unsicher; denn in handelsüblichem 60%igem Schwefelnatrium ist normalerweise etwa 1% Natriumcarbonat enthalten, auf Schwefelnatrium bezogen also weniger als 1 Mol% Natriumcarbonat. Rechnet man nun mit einem relativen Fehler der acidimetrischen und jodometrischen Titration von je 0,5 –1%, so ergibt sich der mittlere Fehler der Differenz zu 0,7—1,4%, d. h. er ist von der gleichen Größenordnung wie der zu bestimmende Natriumcarbonatgehalt selbst.

Nach der von Sack vorgeschlagenen Bestimmung unter Zuhilfenahme der Fällung mit Bariumchlorid sollte man dagegen genauere Resultate erwarten, da der Sulfitgehalt im allgemeinen in der gleichen Größenordnung wie der Carbonatgehalt liegt. Ein Fehler der Sulfitbestimmung von einigen Prozent (rel.) würde also auch nur einen gleichgroßen Fehler der Carbonatbestimmung verursachen.

Vergleichende Carbonatbestimmungen nach beiden Methoden bestätigten diese Erwartung jedoch nicht. So wurde z. B. in der gleichen

Probe Schwefelnatrium aus der Differenz der acidimetrischen und jodometrischen (bzw. argentometrischen[3]) Titration ein Gehalt von 2,99% Natriumcarbonat ermittelt, während die Titration nach Fällung mit Bariumchlorid stark streuende Werte, im Mittel etwa 0,9% ergab. Aus den weiter oben angeführten Gründen ist der erste Wert sicher zu hoch, der zweite jedoch wie weiter unten gezeigt wird, erheblich zu niedrig. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, daß das Schwefeldioxyd vor dem Verkochen teilweise oxydiert wird und sich Bariumsulfat bildet. Der vom Gesamtsäureverbrauch für den Sulfitgehalt in Abzug gebrachte Anteil ist dann zu hoch, der für Natriumcarbonat aus der Differenz ermittelte Säureverbrauch zu niedrig.

Es wurden nun verschiedene Wege eingeschlagen, um diese wahrscheinlich durch teilweise Oxydation des Sulfits bedingte Fehlerquelle auszuschalten, und zwar:

1. Vorsichtige direkte Titration des gefällten Carbonats neben mitgefälltem Sulfit mit 0,1 n Salzsäure;

2. Oxydation des Sulfits zu Sulfat mit Wasserstoffperoxyd und anschließende Bestimmung des Carbonats durch Rücktitration des zugegebenen Säureüberschusses;

3. Acidimetrische Bestimmung des Carbonats nach jodometrischer Bestimmung des Sulfits und gleichzeitiger Oxydation zu Sulfat in der gleichen Fällung.

Nach den Arbeitsweisen 1 und 2 wurden keine befriedigenden Resultate erhalten, die Werte streuten sehr stark. Ein näheres Eingehen auf die ausgeführten Versuche erübrigt sich daher.

Zur Bestimmung von Carbonat und Sulfit nebeneinander nach Arbeitsweise 3 wurde der abfiltrierte und ausgewaschene Niederschlag mit dem Filter in etwas Wasser aufgeschlämmt und mit einem abgemessenen Überschuß von 0,1 n Jodlösung sowie 0,5 n Salzsäure versetzt. Dann wurde der Jodüberschuß mit 0,1 n Thiosulfatlösung und anschließend der Säureüberschuß mit 0,5 n Natronlauge gegen Methylorange oder besser gegen einen entsprechenden Mischindicator (z. B. Methylorange-Indigocarmin[1]) zurücktitriert.

Bei der Berechnung des dem Carbonatgehalt entsprechenden Säureverbrauches muß berücksichtigt werden, daß nach der Reaktion:

$$SO_3^{2-} + J_2 + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+ + 2J^-$$

eine dem Sulfitgehalt des Niederschlages äquivalente Menge Säure gebildet wird. Der Carbonatgehalt entspricht also der Differenz aus der Summe der vorgelegten und der bei Oxydation des Sulfits entstandenen Säure einerseits und der zur Neutralisation des Säureüberschusses verbrauchten Lauge andererseits. Weiter ist darauf zu achten, daß die Thiosulfatlösung neutral reagiert; falls sie mit Natriumcarbonat stabilisiert

ist, muß eine dem Verbrauch an Thiosulfatlösung entsprechende Korrektur des Säureverbrauches angebracht werden.

Da eine zuverlässige Carbonatbestimmung nach den bisherigen Methoden nicht gewährleistet war, wurde zur Prüfung der Arbeitsweise 3 zunächst so verfahren, daß zu je 50 ml derselben Schwefelnatriumlösung (20 g/l) unbekannten Carbonatgehaltes vor der Fällung mit Bariumchlorid abgemessene Mengen Natriumcarbonat (0—6 ml einer Lösung von 20,35 g Na_2CO_3/l) zugesetzt wurden. Wie Tab. 1 zeigt, wurden diese zugesetzten Mengen Natriumcarbonat annähernd richtig wiedergefunden. Bei Versuchsreihe A wurde die Fällung in unverdünnter Lösung, bei Versuchsreihe B nach Zugabe von je 20 ml Alkohol ausgeführt.

Tabelle 1. *Carbonatbestimmung in je 50 ml 2%iger Schwefelnatriumlösung nach Zusatz bekannter Mengen Natriumcarbonat.*

mg Natriumcarbonat					Fehler in mg	
Zugesetzt	Gefunden					
	Gesamt		Zusatz			
	A	B	A	B	A	B
—	26,6	32,6	—	—	—	—
40,7	69,9	77,0	43,3	44,4	2,6	3,7
81,4	112,2	119,8	85,6	87,2	4,2	5,8
122,2	—	163,1	—	130,5	—	8,4

Der Fehler ist stets positiv, bei Versuchsreihe A etwa +5 bis +6%, bei Versuchsreihe B über +6%; er dürfte auf den Einfluß der Luftkohlensäure zurückzuführen sein. Da bei Alkoholzusatz (Versuchsreihe B) der Niederschlag schleimig und schlecht filtrierbar war, ist hier der Fehler infolge erhöhter Filtrationszeit und daher längerer Einwirkung der Luftkohlensäure größer; mit steigendem Carbonatgehalt scheint er in beiden Versuchsreihen relativ abzunehmen. Aber selbst wenn man dementsprechend für die Bestimmung des in Schwefelnatrium ursprünglich enthaltenen Carbonates mit einem Fehler von über 6% bis vielleicht 10% rechnet, wäre ein solcher noch durchaus tragbar, da er bei einem Gehalt von etwa 1% Natriumcarbonat noch unter 0,1% abs. läge.

Bei den nun ausgeführten Carbonatbestimmungen ergaben sich zwar bei gleicher Einwaage (gleiche aliquote Teile der Probelösung) gut reproduzierbare Ergebnisse, jedoch waren die erhaltenen Absolutwerte von der Höhe der Einwaage stark abhängig. So wurden in dem Schwefelnatriummuster, dessen Carbonatgehalt nach der von Sack vorgeschlagenen Methode etwa 0,9%, nach dem oben erwähnten Betriebsverfahren 2,99% $NaCO_3$ betragen sollte, in Abhängigkeit von der Einwaage gefunden:

3,92% Na_2CO_3 bei 0,5 g Einwaage,
3,22% „ „ 1,0 g „ und
3,00% „ „ 2,0 g „ .

Der durch die Einwirkung der Luftkohlensäure bedingte Blindwert fällt also bei kleiner werdender Einwaage bzw. geringeren Carbonatgehalten erheblich stärker ins Gewicht. Dies ist verständlich, denn auch beim Versetzen carbonatfreier Schwefelnatriumlösungen mit Bariumchlorid muß sich infolge der alkalischen Reaktion der Lösung Bariumcarbonat bilden durch Einwirkung der Luftkohlensäure; nur soweit deren Einwirkungszeit etwa mit wachsender Filtrationsdauer bei steigenden Bariumcarbonatmengen unter sonst gleichen Versuchsbedingungen zunimmt, ist auch dieser Blindwert von der Höhe des Carbonatgehaltes abhängig. Vernachlässigt man diese Abhängigkeit und nimmt zunächst einmal an, daß der Blindwert bei gleicher Arbeitsweise annähernd konstant ist, so läßt er sich aus in gleicher Weise ausgeführten Bestimmungen mit verschiedener Einwaage einfach berechnen. Ist:

G der tatsächliche prozentuale Gehalt der Probe an Natriumcarbonat;
Gn der gefundene Carbonatgehalt bei
En g Einwaage;
B der Blindwert in Gramm Natriumcarbonat bei einer bestimmten Arbeitsweise, so ergibt sich:

$$G = Gn - \frac{100}{En} \cdot B.$$

Aus 2 Parallelbestimmungen mit den Einwaagen E_1 und E_2 errechnet sich dann der Blindwert zu:

$$B = \frac{(G_1 - G_2) \cdot E_1 \cdot E_2}{100\,(E_2 - E_1)}\ \text{g}\ Na_2CO_3.$$

Für das oben angeführte Titrationsbeispiel würden sich die in Tab. 2 zusammengestellten Werte für den Blindwert bzw. den mit Hilfe des mittleren Blindwertes korrigierten, tatsächlichen Gehalt an Natriumcarbonat ergeben.

Tabelle 2. *Carbonatbestimmung mit Blindwertkorrektur aus Analysen mit verschiedener Einwaage.*

Blindwert		Natriumcarbonat, gefunden:		
Berechnet aus Analysen	In mg Na_2CO_3	Gesamtmenge in mg	Bei Analyse	In Prozent, korrigiert
1 und 2	7,0	19,6	1	2,76 ± 0,22
1 und 3	6,1	32,2	2	2,64 ± 0,11
2 und 3	4,4	60,0	3	2,71 ± 0,06
Mittelwert	5,8 ± 1,1			2,70 ± 0,11

Die Streuung des Blindwertes sowie die Fehlerbreite des ermittelten Carbonatgehaltes liegen im Bereich der Titrationsgenauigkeit (1 mg Na_2CO_3 = 0,038 ml 0,5 n Säure).

Mit einer Konstanz des Blindwertes wird man naturgemäß nur bei stets gleicher Einwirkung der Luftkohlensäure rechnen können, d. h.

vor allem bei Fällung aus gleichem Volumen in Gefäßen gleicher Form und Größe und gleicher Filtrationsdauer. Letztere ist nun aber von der Menge des zu filtrierenden Niederschlages abhängig, und zwar um so mehr, je schlechter filtrierbar der Niederschlag ist und je kleiner das Volumen der Lösung im Verhältnis zur Niederschlagsmenge ist, wie die in Tab. 1 wiedergegebenen Versuche zeigen. Dieser von der Menge des vorliegenden Carbonats abhängige Fehler muß nun um so kleiner werden, je geringer der Einfluß der Niederschlagsmenge auf die Filtrationsdauer ist, d. h. je größer das Verhältnis des zu filtrierenden Volumens zur Niederschlagsmenge und je besser filtrierbar der Niederschlag ist.

Es wurde daher die Probe (aliquote Teile von 20 bzw. 40 g Probe/Liter enthaltenden Lösungen) vor der Fällung stets auf 150 ml verdünnt und zur Fällung von Carbonat, Sulfit und Sulfat mit 10 ml einer 10%igen Bariumchloridlösung versetzt. Nach vorsichtigem Vermischen durch mehrmaliges Umschwenken und 2 min Stehenlassen zum Absitzen des Niederschlages wurde durch ein gehärtetes Filter filtriert, das Fällungsgefäß mit ausgekochtem Wasser 3mal nachgespült und der Niederschlag auf dem Filter zum Schluß mit 1%iger Bariumchloridlösung bis zur neutralen Reaktion der ablaufenden Waschflüssigkeit gewaschen. Die von der Niederschlagsmenge abhängige Zeit des Auswaschens dürfte keinen größeren Einfluß mehr haben, da die alkalische, überschüssige Barium-Ionen enthaltende Lösung durch das Waschen mit Wasser rasch verdünnt bzw. verdrängt wird, und sich beim Nachwaschen mit neutraler Bariumchloridlösung kein Bariumcarbonat mehr bilden kann. Die anschließende Bestimmung des Sulfit- und Carbonatgehaltes in dem so erhaltenen Niederschlag wurde wie weiter oben angegeben ausgeführt. Tab. 3 gibt einige so durchgeführte Titrationsbeispiele wieder.

Tabelle 3. *Carbonatbestimmung nach Arbeitsweise 3 mit Blindwertkorrektur.*

Einwaage in Gramm	Prozent Na_2CO_3		Blindwert, berechnet	
	Gefunden	Korrigiert	aus Analysen	mg Na_2CO_3
Probe A: Nach Fällung sofort filtriert:				
1	1,52	1,06 ± 0,10	1 und 2	3,6
2	1,34	1,11 ± 0,05	1 und 3	4,2
3	1,24	1,09 ± 0,03	2 und 3	6,0
			Mittelwert:	4,6 ± 1,0
Probe B. Nach Fällung 2 min stehen gelassen:				
1	3,35	2,51 ± 0,10	1 und 3	7,4
1	3,45	2,61 ± 0,10	2und 3	9,4
2	2,98	2,56 ± 0,05	Mittelwert:	8,4 ± 1,0

Zur Bestimmung des Carbonatgehaltes nach dieser Arbeitsweise sind also mindestens 2 Parallelanalysen mit verschiedenen aliquoten Teilen der Probelösung erforderlich, um den zur Korrektur der gefundenen Werte erforderlichen Blindwert zu ermitteln. Bei gleichzeitiger Untersuchung mehrerer Schwefelnatriumproben oder bei laufenden Bestimmungen wird es genügen, den Blindwert nur einmal in dieser Weise

festzustellen oder gelegentlich zu kontrollieren, falls nicht extreme Carbonatgehalte auftreten.

Das Stehenlassen der Fällung vor dem Filtrieren erhöht zwar, wie die in Tab. 3 wiedergegebenen Analysen erkennen lassen, den Blindwert, trotzdem wurde diese Arbeitsweise gewählt. Einmal ist so die Filtrationsdauer weniger von der Menge des Niederschlages abhängig, da dieser nach Dekantieren der überstehenden Lösung durch das Filter erst zum Schluß auf das Filter gespült wird; zum anderen erwies sich das Stehenlassen als notwendig, wenn aus der sowieso erforderlichen jodometrischen Bestimmung des mitgefällten Sulfits der Sulfitgehalt der Probe richtig ermittelt werden soll.

Eine derartige Sulfitbestimmung hätte gegenüber der bisher üblichen jodometrischen Differenzbestimmung den Vorteil, daß der Sulfitgehalt direkt und ohne zusätzliche analytische Arbeit ermittelt werden könnte. Es wurden jedoch, wenn sofort nach erfolgter Fällung mit Bariumchlorid filtriert wurde, keine reproduzierbaren, mit den auf jodometrischem Wege erhaltenen Werten übereinstimmenden Resultate erzielt; in der Regel lagen die nach Fällung als Bariumsulfit ermittelten Werte mehr oder weniger zu niedrig. Aus diesem Grunde wurde, wie bereits oben erwähnt, die Fällung versuchsweise nach Zusatz von Alkohol ausgeführt; hierdurch wurde zwar die Vollständigkeit der Sulfitfällung verbessert, die Filtrierbarkeit des Niederschlages jedoch erheblich verschlechtert und der Blindwert stark erhöht (vgl. Tab. 1). Bei mindestens 2 min langem Stehenlassen nach der Fällung wurden dagegen auch aus rein wäßriger Lösung gut reproduzierbare Sulfitwerte erhalten, die mit den indirekt jodometrisch ermittelten Resultaten sehr gut übereinstimmten. Da die Sulfitbestimmung nicht eingehender untersucht wurde, sei hier nur auf diese einfache Möglichkeit der direkten Mitbestimmung des Sulfitgehaltes hingewiesen.

Ein Nachteil der vorgeschlagenen Arbeitsweise zur Bestimmung des Carbonatgehaltes liegt in der absoluten Höhe des Blindwertes und seiner Empfindlichkeit gegen geringfügige Änderungen der Arbeitsweise; auch bei Einwaagen von 2 g kann er bei Gehalten von 1% Na_2CO_3 annähernd 50% der zu bestimmenden Carbonatmenge erreichen, so daß die Genauigkeit des Verfahrens nicht sehr groß ist, auch wenn sie im allgemeinen ausreichend sein dürfte und eine erhebliche Verbesserung gegenüber den bisherigen, völlig unsicheren Verfahren bedeutet.

Eine Herabsetzung des Blindwertes und damit eine wesentliche Verbesserung des Verfahrens ließe sich vielleicht durch Zusatz eines Überschusses von Ammoniumchlorid vor oder sofort nach dem Einpipettieren der Probelösung in das Fällungsgefäß erzielen. Hierdurch würde die stark alkalisch reagierende Natriumsulfidlösung sofort stark abgepuffert und damit ihre Empfindlichkeit gegen Luftkohlensäure erheblich herab-

gesetzt. Da derartige Versuche nicht mehr ausgeführt werden konnten, sei nur auf die mögliche Verbesserung der Methode auf diesem Wege hingewiesen.

Zusammenfassung.

Zur Bestimmung des Carbonatgehaltes in technischem Schwefelnatrium werden in einem aliquoten Teil der Lösung der Probe zunächst Carbonat, Sulfit und Sulfat mit Bariumchlorid gefällt und der Niederschlag in einem abgemessenen Überschuß von 0,5 n Salzsäure und 0,1 n Jodlösung gelöst. Sulfit wird hierbei zu Sulfat oxydiert unter Bildung einer äquivalenten Menge Säure. Das nicht verbrauchte Jod wird mit Thiosulfat, der Säureüberschuß anschließend mit Lauge zurücktitriert. Die Summe des ermittelten Säure- und Jodverbrauches ist dem Carbonatgehalt äquivalent. Nach Ermittlung des durch die Einwirkung der Luftkohlensäure während des Fällens und Filtrierens bedingten Blindwertes aus mindestens 2 Parallelbestimmungen mit verschiedenen aliquoten Teilen der Probelösung und entsprechender Korrektur kann der Gehalt an Natriumcarbonat in technischem Schwefelnatrium (etwa 1% Na_2CO_3 und mehr) auf $\pm 0{,}1$—0,2% (abs.) genau bestimmt werden.

Auf Möglichkeiten zur weiteren Verbesserung des Verfahrens sowie zur gleichzeitigen direkten Sulfitbestimmung wurde hingewiesen.

Für die Ausführung zahlreicher Analysen sei auch an dieser Stelle Fräulein Ada Mansholt und Fräulein Charlotte Schubert herzlichst gedankt.

Literatur.

[1] Vgl. z. B. Kolthoff, I. M. u. V. A. Stenger: Volumetric Analysis, Bd. II, S. 58, New York 1947. — [2] Vgl. Kurtenacker, A.: Analytische Chemie der Sauerstoffsäuren des Schwefels, S. 134 (Die Chemische Analyse, Bd. 38, Stuttgart 1938). — [3] Sack, W.: diese Z. **131**, 199—207 (1950).

Dozent Dr. phil. habil. Karl Ernst Stumpf, Hannover, Veilchenstr. 2A.

Bericht über die Fortschritte der analytischen Chemie.

I. Allgemeine analytische Methoden, analytische Operationen, Apparate und Reagenzien.

Literatur. G. M. Reiner: *Sintesi ed Applicazioni dei Reagenti organici nell'analisi chimica.* XXX, 449 Seiten mit 8 Abbildungen. Verlag Ulrico Hoepli, Milano. 1953.

Das mit einem Geleitwort von R. Rigamonti versehene Buch behandelt zunächst die Herstellung von 133 organischen Reagenzien und anschließend ihre analytische Verwendung. Dabei sind die Kationen nach analytischen Gruppen geordnet. Sorgfältige Literaturangaben ermöglichen die weitgehende Benutzung der Originalliteratur. Im Anhang werden Hinweise auf weitere Möglichkeiten, die während des Druckes bekannt geworden sind, gegeben.

L. M. Granderye: *Traité pratique d'analyse par voie sèche.* Bd. III von Documents d'analyse chimique von A. Lassieur. VIII, 119 Seiten mit 14 Abbildungen. Verlag Dunod, Paris 1953. Preis brosch. fFr. 780.

Der Verfasser gibt einen Analysenweg an, um 56 Elemente auf trockenem Wege zu bestimmen. Soweit wie nötig werden auch Identifizierungsreaktionen auf nassem Wege angeführt. Beachtenswert ist die ausführliche Art, mit der das einzelne Vorgehen beschrieben wird. Im Anschluß an den systematischen Gang werden die Flammenreaktionen für die einzelnen Elemente besprochen. Jedem, der Interesse für diese Verfahren hat, kann die Durchsicht des Büchleins empfohlen werden.

Proceedings of the international congress on analytical chemistry Oxford England, 4 th to 9th September, 1952. Published for The International Congress on Analytical Chemistry and The Society of Public Analysts and Other Analytical Chemists. XII, 493 Seiten mit zahlreichen Abbildungen. Verlag W. Hefter & Sons Ltd., Cambridge, England. Preis etwa 33,—.

In dem Buch sind die Vorträge sowie die anschließenden Diskussionen gelegentlich des internationalen Kongresses für analytische Chemie in Oxford 1952 enthalten. Ein ausführliches Autoren- und Sachregister erleichtert das Aufsuchen der interessierenden Fachgebiete. Der Inhalt ist weitgehend ein Nachdruck aus The Analyst (London) **77**, 557—1024 (1952). A. Gehring.

W. Hans und H.-U. Bergmeyer: *Leybold polarographische Berichte.* Bd. I, Heft 1—2. 54 Seiten. Staufen-Verlag Köln, Oktober 1952. Preis jährlich DM 10,—.

Das je mit einem Geleitwort von J. Heyrovský und M. v. Stackelberg versehene Bändchen liefert kurze Berichte über die neuesten Arbeiten aus dem gesamten Gebiet der Polarographie. Weiterhin enthält es einige Originalmitteilungen, allgemeine Mitteilungen sowie Fragen und Antworten. Die Hefte sollen vierteljährlich erscheinen.

I. M. Kolthoff und J. J. Lingane: *Polarography*, 2. Aufl., Bd. 1 und 2. XVI, XVII, 990 Seiten. Verlag Interscience Publishers, New York and London 1952. Preis für Bd. 1 geb. $ 9,— und für Bd. 2 geb. $ 11,—.

Zwei hervorragende Kenner der Polarographie haben ein mit zahlreichen Abbildungen versehenes Nachschlagewerk über das Gesamtgebiet der Polarographie herausgebracht. Während im Band 1 die Theorie, die Methodik und die allgemeinen Ausführungsformen der Polarographie beschrieben sind, enthält Band 2 spezielle Analysenverfahren der anorganischen und organischen Polarographie, ihre Anwendungen in der Biologie sowie Beispiele amperometrischer Titration.

Ein ausführliches Autoren- und Sachregister ermöglicht dem Benutzer ein schnelles Auffinden der ihn interessierenden Daten. Das Werk sollte daher in jeder chemischen Fachbibliothek vorhanden sein. O. Fuchs.

H. Biltz, W. Klemm und W. Fischer: *Experimentelle Einführung in die anorganische Chemie.* 45.—47. Auflage. X, 191 Seiten mit 24 Abbildungen und 1 Tafel. Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin W 35, 1953. Preis Halbl. DM 10,80.

Da die neue Auflage sich nur durch zahlreiche kleinere Korrekturen von der vorhergehenden[1] unterscheidet, mag es genügen, darauf hinzuweisen, daß das beliebte und vielen Generationen von Chemikern vertraute Buch wieder erschienen ist. A. Gehring.

R. C. Evans: *Einführung in die Kristallchemie.* Ins Deutsche übertragen von E. Thilo. VIII, 307 Seiten mit 113 Abbildungen im Text. Verlag Johann Ambrosius Barth, Leipzig 1954. Preis geb. DM 14,—.

Das sowohl den Physikochemiker als auch den Mineralogen interessierende Gebiet der Kristallchemie hat der Verfasser in ausgezeichneter Weise dargestellt.

[1] Vgl. diese Z. **132**, 37 (1951).

Nach einer ausführlichen Beschreibung der Kristallgitter erfolgt die Besprechung der systematischen Kristallchemie insbesondere der Metalle, Legierungen und Silicate. Einen breiten Raum findet hierbei die Auslegung der Begriffe: isodesmische, mesodesmische und anisodesmische Struktur. Den Schluß des Werkes bildet die Kristallchemie der Wasserstoff enthaltenden Ionenverbindungen und der Molekülverbindungen. Möge dieses ausgezeichnete Werk auch weiteste Verbreitung in der angewandten Chemie finden!

E. Sauer: *Kolloidchemisches Praktikum*. 2. Aufl., XII, 122 Seiten mit 52 Abbildungen. Verlag für angewandte Wissenschaften, Wiesbaden 1953. Preis brosch. DM 6,80, geb. DM 9,80.

Das im Quartformat erschienene Bändchen erläutert in anschaulicher Weise die für den Kolloidchemiker unentbehrlichen Arbeitsmethoden, unter anderen die Papierchromatographie. Damit hierzu geeignete Apparaturen rasch zur Verfügung stehen, ist im Anhang des Büchleins ein Bezugsquellenverzeichnis bekannter Firmen eingefügt. Das Bändchen kann allen, die mit einschlägigen Untersuchungen zu tun haben, besonders auch den Studierenden, warm empfohlen werden.

O. Fuchs.

Chromatographie. *Die Trennung von Gemischen gleichartiger polymerer Verbindungen* scheiterte bisher vor allem daran, daß die verhältnismäßig großen Moleküle in die zur Chromatographie verwendeten porösen Materialien (Pulver, Papier) nicht eindringen können. Ein Ausweg aus dieser Schwierigkeit scheint in der *elektrokinetischen Ultrafiltration* zu bestehen, deren sich D. L. Mould und R. L. M. Synge[1] bedienen, um verhältnismäßig noch niedermolekulare stärkeartige Polysaccharide, die durch enzymatische Synthese aus Maltohexaose oder Maltoheptaose in Gegenwart von Glucose-1-phosphat gewonnen waren, nach ihren Polymerisationsgraden aufzuteilen. Es handelte sich um geradkettige Moleküle, deren Glucoseeinheiten durch α-1,4-Bindungen miteinander verknüpft waren und bei denen die durchschnittliche Kettenlänge aus dem bei der Synthese freigewordenen anorganischen Phosphat geschätzt werden konnte. Zur Trennung werden 1,3 × 8,0 cm große Collodium-Ultrafiltrationsmembranstreifen von verschiedenen Graden der Porosität von 1 mm Dicke benutzt, die vor Gebrauch in 0,2 n Essigsäure aufbewahrt werden. Man stellt sie senkrecht in ein weites Reagensglas, durch dessen Boden ein Platindraht als Kathode ragt. Der Draht und das untere Ende der Membran stehen in 0,2 n Essigsäure. Darüber ist der Hauptteil der Membran von flüssigem Paraffin umgeben. Oben endet die Membran in einer Kammer, die als Anode ebenfalls einen Platindraht und als Anolyten das Polysaccharidgemisch zu 1% gelöst in verdünnter Essigsäure enthält und durch Gummidichtungen vom Paraffin abgeteilt wird. An die Elektroden legt man eine Spannung von 250 V, worauf die Polysaccharide durch Elektroendosmose in die Membran wandern. Die Anodenkammer spült man, solange die Spannung anliegt, kontinuierlich mit 0,2 n Essigsäure durch (entsprechend dem Entwickeln von Chromatogrammen mit frischem Lösungsmittel). Nimmt man nach geeigneter Zeit (durch Vorversuche zu ermitteln) die Membran heraus und besprüht sie mit Jod-Jodkaliumlösung, so erhält man Farbflecken, die oft sauber voneinander getrennt sind und die gelungene Aufteilung des Polysaccharidgemisches anzeigen. Um die R_f-Werte zu berechnen, mischt man unter die Polysaccharidlösung 10% Fructose als Vergleichssubstanz und stellt deren Ort an einem von der Membran abgeschnittenen Längsstreifen mit einer der bekannten Farbreaktionen fest. — Das von den Verf. untersuchte Polysaccharidgemisch enthielt Moleküle mit Durchschnittspolymerisationsgraden von 35—250. In Membrane

[1] Analyst (London) **77**, 964—969 (1952). Rowett Res. Inst., Bucksburn, Aberdeensh. (England).

mit über 500 mμ mittlerem Porendurchmesser konnten alle Moleküle eindringen und wurden entsprechend ihrer Adsorption an den inneren Oberflächen wie bei der Chromatographie aufgeteilt. Auf dichteren Membranen werden Moleküle, die eine bestimmte Länge überschreiten, gewissermaßen „abfiltriert". — Auf hochpolymere Substanzen wird die Methode nach Ansicht der Verf. nicht anwendbar sein.

F. Neumann.

E. D. Smith, W. A. Mueller und L. N. Rogers[1] entwickeln ein chromatographisches Verfahren zur Trennung von Essigsäure, Mono- und Dichloressigsäure. Das Verfahren ist zur Reinheitsprüfung von technischer Monochloressigsäure geeignet, deren wichtigste Verunreinigungen Essigsäure und Dichloressigsäure sind. Zur quantitativen Bestimmung werden die 3 Säuren aus dem entwickelten Chromatogramm herausgelöst und mit Natronlauge titriert. Ein Chromatographierrohr von 19 mm Durchmesser und 200 mm Länge wird unter dem Vakuum der Wasserstrahlpumpe mit einer Mischung von 2,5 Teilen *Kieselsäure* und 1 Teil „*Celite*" bis zu einer Höhe von 12 cm gefüllt. Etwa 0,10 ml der zu untersuchenden geschmolzenen Monochloressigsäure werden in 10 ml Benzol gelöst und davon 3 ml auf das Adsorbens gegeben. Wenn die Lösung vollständig eingedrungen ist, werden 30 ml einer Lösung von 20% Methylamylketon und 2% Amylalkohol in Petroläther A als Entwickler nachgegeben. Wenn der letzte Rest davon von der Säule aufgenommen ist, wird noch 5—8 sec weiter gesaugt und dann die Säule in einem Stück ausgestoßen. Durch leichtes Bepinseln mit einer 1%igen wäßrigen Lösung von Kongorot werden die 3 sauren Zonen, die den 3 verschiedenen Säuren entsprechen, gegeneinander abgegrenzt. Die Säule wird in diese 3 Stücke zerschnitten, gepulvert und dann werden mit Methanol die Säuren einzeln herausgelöst. Man spült mit Wasser nach und titriert die erhaltenen Lösungen mit 0,05 n Natronlauge potentiometrisch auf p_H 8,5. Auch gegen Phenolphthalein kann titriert werden, doch muß man davon 1—2 ml zugeben und die mit Kongorot bestrichenen Flächen vorsichtig abkratzen, damit die beiden Indicatoren sich nicht gegenseitig stören. Von der verbrauchten NaOH-Lösung werden bei der Dichloressigsäure 0,07 ml, von den beiden anderen 0,20 ml als Korrektur abgezogen. — Die prozentuale Zusammensetzung wird so gefunden, daß man die Summe der titrimetrisch gefundenen Säuren = 100 setzt; dadurch ist es nicht nötig, eine genaue Menge von Monochloressigsäure für die Analyse abzupipettieren.

G. Denk.

Einige Verbesserungen in der Technik der Chromatographie, besonders für Aufgaben der Terpenchemie, schlagen J. M. Miller und J. G. Kirchner[2] vor. Zur Eingrenzung der gewünschten Eluatfraktionen bewährt sich aufs neue die kürzlich von gleicher Seite[3] veröffentlichte „Chromatostrip"-Methode; als Säulenfüllung dient ein folgendermaßen hergestelltes Gemisch von *Kieselsäure und Stärke*. Kieselsäure wird mit Aceton, dann mit Wasser gewaschen und darauf mit 5% ihres Trockengewichts Amiocastärke und 200% ihres Trockengewichts an Wasser gut gemischt. Der Brei wird auf dem Wasserbad bei 85° C bis zum Dickwerden erhitzt, die entstandene Paste etwa 6 mm dick auf Glasplatten gestrichen und 2 Std lang in einem auf 80° C gehaltenen Ofen in einem Strom von mit Kieselsäurefilter gereinigter Luft getrocknet. Das getrocknete Adsorbens wird 30 min lang in einer Kugelmühle gemahlen, schließlich im Vakuumexsiccator über Ascarite aufbewahrt. — Für die

[1] Analyt. Chemistry **24**, 1117—1119 (1952). The Buckeye Cotton Oil Co., Memphis, Tenn. (USA).

[2] Analyt. Chemistry **24**, 1480—1482 (1952). Fruit, Vegetable Chem. Lab., US. Dept. Agricult., Pasadena, Calif.

[3] Kirchner, J. G., J. M. Miller und G. Keller: Analyt. Chemistry **23**, 420 (1951); vgl. diese Z. **136**, 370 (1952).

Anwendung dieses Adsorbenses wird folgende Technik empfohlen: Das Pulver wird mit der 4—5fachen Menge Lösungsmittel (dem nämlichen, das auch zur chromatographischen Entwicklung dient) angeteigt, intensiv durchgerührt, der Brei in die Säule gegossen und dort abermals kräftig gerührt. Im Interesse einer sauberen Ausbildung der Chromatogramme sind anhaftende Adsorbensreste an der Glaswand zu vermeiden. Nach Erreichen einer gewissen Füllhöhe wird durch Stickstoff (nicht Kohlendioxyd oder ähnlich lösliche Gase!) die feste Füllung zusammengepreßt und zugleich das überschüssige Lösungsmittel entfernt. Die Fülloperation wird, so oft erforderlich, wiederholt, wobei nach jedem neuen Einbringen von Brei mit einem genügend langen Spatel gut durchzurühren ist, jeweils bis 2,5 cm unterhalb der Oberfläche der vorhergehenden Lage. Gelindes Klopfen der Rohrwand während des Absitzens begünstigt die Gleichmäßigkeit der Füllung. Ist die Säule genügend hoch beschickt, wird die überstehende Flüssigkeit durch N_2-Druck bis gerade zur Höhe der festen Füllung entfernt, die Probe alsdann gleichfalls unter Druck in das Adsorbens eingepreßt und vorsichtig frisches Lösungsmittel aufgegeben. Die Beschikkung der Säule *als Brei* in der empfohlenen Weise führt nach den Feststellungen der Verf. zu einer viel gleichmäßigeren Zonenbildung als bei *trockener Beschickung* (in der Arbeit durch mehrere Fotos belegt); ferner ist eine eindeutige Beschleunigung des Durchflusses nach Druckbehandlung festzustellen (1 ml Hexan/3 min *ohne*, 3 ml 1 min *nach* Druckbehandlung bei sonst gleichen Bedingungen). Folgende Aufgaben aus dem *Terpengebiet* wurden mittels des Verfahrens befriedigend gelöst: *Trennung der Reaktionsprodukte einer Carvon-Reduktion, Reinigung von Linalool-Monoxyd, Reinigung von N-Methyl-methylanthranilat.*

Eine zweidimensionale Papierchromatographie unter Verwendung „eindimensionaler" Geräte beschreibt L. A. Boggs[1]. Das Verfahren ist besonders für Zuckergemische, z. B. *Xylose, Arabinose, Mannose, Glucose, Galaktose aus Sulfitablauge* gedacht, für die die begrenzte Steighöhe des Lösungsmittels bei „aufsteigender" Technik nicht ausreicht und zugleich die unhandlichen Abmessungen „zweidimensionaler" Tanks vermieden werden sollen. Das Prinzip der Methode ist in Abb. 1 veranschaulicht: Filterstreifen (Whatman Nr. 1) von 57 cm Länge werden 9 cm vom oberen Ende entfernt mit einem Bleistiftstrich als Startlinie versehen. Senkrecht dazu werden Vertikallinien mit 2 cm Abstand gezeichnet (Abb. 1, A). Auf die 8 Schnittpunkte von Startlinie und Vertikalstrichen werden mittels einer feinen Platinöse wäßrige oder wäßrig-alkoholische Tröpfchen folgender Lösungen (bzw. Flüssigkeiten) in der hier genannten Reihenfolge aufgebracht: a) Mischung bekannter Standardzucker, b) unbekannte Mischung (Analyse), c) Blindprobe, d) Analyse, e) Blindprobe, f) Analyse, g) und h) Mischung von Standardzuckern. Die Entwicklung geschieht in „absteigender" Technik; die erforderliche

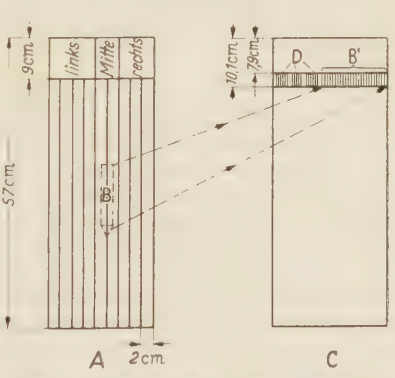


Abb. 1. Zweidimensionale Papierchromatographie nach der „Einflecht-Technik" von L. A. Boggs. *A* Papierstreifen für die erstdimensionale Entwicklung; *B* Nicht besprühter, zuckerhaltiger Streifenausschnitt der Erstentwicklung; *B'* Reihe von Vertikalschlitzen zur Aufnahme des Streifenteils *B*; *C* Basisstreifen für die zweitdimensionale Entwicklung; *D* Vertikalschlitze zur Aufnahme der Standardzucker.

[1] Analyt. Chemistry 24, 1673—1675 (1952). Sulphite Pulpe Manufacturer's Res. League, Appleton, Wis. (USA).

Entwicklungsdauer wird im Vorversuch festgelegt. Nach Trocknung bei Raumtemperatur wird der chromatographische Streifen längs der beiden „Blindvertikalen" in 3 Teilstreifen zerschnitten. Der mittlere von ihnen wird für die zweite Entwicklung zurückgehalten; die beiden äußeren als „Indicatorstreifen" werden mit einer Lösung von 0,2 g p-Anisidin + 1,0 g Trichloressigsäure in 50 ml Wasser besprüht. Nach Trocknung bei 100—150° C geben sich Aldosen durch braune, Fructose durch gelbe Flecken zu erkennen.

Nun wird aus dem nicht besprühten Mittelstreifen ein die interessierenden Zucker enthaltendes Teilstück von 2 cm Breite herausgeschnitten (B, Abb. 1) und als „Startstreifen" in ein neues Chromatogramm eingeflochten (B'). Zu diesem Zweck werden auf letzterem 2 Bleistiftlinien im Abstand 7,9 und 10,1 cm vom oberen Rand angebracht. Der Streifen zwischen beiden Linien, und zwar in den Ausmaßen des Streifenstücks P (vertikal betrachtet, vgl. Abbildung) wird mit einer Reihe 3–5 mm voneinander entfernter Vertikalschlitze (mit einer Rasierklinge auf untergelegtem Karton zu schneiden!) versehen, durch die der Streifen B in Flechtmanier hindurchgezogen wird. Tüpfel bekannter Standardzucker können vergleichshalber dadurch mitentwickelt werden, daß man sie auf einzelnen, kurzen 2 cm-Filterstreifen aufbringt und letztere in der nämlichen Weise in den Startstreifen des neuen Chromatogramms einflicht wie das transplantierte Stück B. Diesem Zweck dient der zunächst nicht geschlitzte Teil des Startstreifens (C, Abb. 1), der dann nach Erfordernis gleichfalls mit der nötigen Zahl von Schnitten zu versehen ist. Als empfehlenswerte Entwicklermischungen werden genannt: 1. Entwicklung: bei 30° C mit Wasser gesättigtes Phenol (Trocknung 24 Std bei Raumtemperatur); 2. Entwicklung: Äthylacetat-Essigsäure-Wasser (9:2:2). Eine hinreichende Trennung der einzelnen Zucker wird bei 20—36 Std Entwicklung erzielt; zur Trocknung nach der zweiten Entwicklung genügt 1 Std bei Raumtemperatur. Bezüglich einer Reihe näherer Einzelheiten, insbesondere auch der Vorbereitung der Sulfitablauge zur chromatographischen Analyse, sei auf die Originalstelle verwiesen.

R. Klockmann.

Die Titration in organischen Lösungsmitteln ist nach A. Kirrmann und Nelly Daune-Dubois[1] für die Nebeneinanderbestimmung von Säuren, die z. B. bei der Herstellung von Kunstharzen benötigt werden, zu empfehlen. Die Versuche der Verf. beziehen sich auf Gemische von *Phthalsäureanhydrid, Monomethylphthalat, primärem Kaliumphthalat und Ölsäure*. An Stelle von Phthalsäureanhydrid wurde auch *Bernsteinsäure* untersucht, die ähnliche Dissoziationskonstanten wie die Phthalsäure besitzt. In wäßriger Lösung ist es nicht möglich, Monomethylphthalat und Phthalsäureanhydrid nebeneinander zu bestimmen. In *Dimethylformamid* als Lösungsmittel sind dagegen bei potentiometrischer Titration mit wäßriger Kalilauge 3 scharf getrennte Neutralisationsstufen zu erkennen. In diesem Medium sind also die Dissoziationskonstanten von Monomethylphthalat und Monokaliumphthalat deutlich verschieden. Auch Ölsäure und Monomethylphthalat sowie Phthalsäureanhydrid und Ölsäure lassen sich nebeneinander bestimmen, wobei der zweite Neutralisationspunkt des Phthalsäureanhydrids in Anwesenheit von Ölsäure der Neutralisation der Hälfte des Anhydrids und der Hälfte der Ölsäure entspricht. Die Gegenwart einer dritten starken Säure (Bernsteinsäure) stört. Im Gemisch mit Monomethylphthalat wird die Bernsteinsäure in erster Stufe gleichzeitig mit Monomethylphthalat titriert. Die Genauigkeit der Bestimmungen schwankt von 1—5%, bei Monomethylphthalat und Ölsäure zwischen 1 und 10%. Die potentiometrischen Titrationen wurden von den Verf. entweder unter Verwendung einer Kalomelelektrode und einer Platinelektrode oder unter Verwendung von zwei Platinelektroden

[1] C. R. Acad. Sci. (Paris) **236**, 1361 (1953).

von denen eine verzögert ist, durchgeführt. Das als Lösungsmittel dienende Dimethylformamid besitzt eine hohe Dielektrizitätskonstante und eignet sich auch deshalb gut, weil es mit den untersuchten Säuren nicht reagiert. Als Redoxsystem verwendeten die Verf. eine äquimolekulare Mischung von Chloranil und Hydrochloranil in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ g/ml. Als Maßflüssigkeit diente eine 0,5 n wäßrige Kalilauge. Von alkoholischer Kalilauge wurde abgesehen, da sie während der Neutralisation des Phthalsäureanhydrids zur Esterbildung Anlaß gibt.

H. Kurtenacker.

Bei der potentiometrischen Titration einer Anzahl von substituierten Pyrazolen mit 0,1 n Überchlorsäure in Eisessig fanden St. Veibel, K. Eggersen und S. C. Linholt[1], daß nur solche Pyrazolone als Basen titriert werden können, die durch ein bewegliches Wasserstoffatom im Kern konjugierte Doppelbindungen aufbauen können und damit eine Pyrazolstruktur annehmen. Aus den Titrationskurven werden ferner die $pK_{B(H_2O)}$-Werte dieser Verbindungen errechnet.

Zur Bestimmung von Theobromin eignet sich nach A. Poulos[2] die *Titration in nichtwäßriger Lösung* unter folgenden Bedingungen: 0,3 g Theobromin werden unter gelindem Erwärmen in 30 ml Eisessig gelöst und auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 30 ml Tetrachlorkohlenstoff und 3 Tropfen einer 1%igen essigsauren Lösung von α-Naphtholbenzein wird mit 0,1 n Überchlorsäure titriert, bis die Farbe von gelb nach grün umschlägt, wobei je Mol Theobromin 1 g-Äquivalent $HClO_4$ verbraucht wird. Die 0,1 n Überchlorsäurelösung wird dargestellt durch Verdünnen von 8,5 ml 72%iger Überchlorsäure mit Eisessig auf 1000 ml. — Auch *Theophyllin* kann so bestimmt werden, nur müssen dann 100 ml CCl_4 zugegeben werden. Die Titration von Coffein dagegen gelang auf diesem Wege nicht. G. Denk.

Die Abtrennung der dreiwertigen von den zweiwertigen Metallen nach der Methode von B. Šolaja[3] wird von S. K. Šušić und N. V. Njegovan[4] etwas vereinfacht, d. h. verbilligt. Der Šolajaschen Methode liegt folgende Summengleichung zugrunde:

$$2\,FeCl_3 + 3\,HgNH_2Cl + 6\,H_2O \rightarrow 2\,Fe(OH)_3 + 3\,HgCl_2 + 3\,NH_4Cl.$$

Da immer mit 2—5 Teilen $HgNH_2Cl$ im Überschuß gearbeitet werden muß, ist die Anwendung von $HgNH_2Cl$, insbesondere bei Reihenanalysen zu teuer. Die Verf. schlagen deshalb folgende abgeänderte Arbeitsweise für die Trennung Eisen/Mangan vor: Die zu untersuchende Lösung (mit NH_3 nahezu neutralisiert) wird mit einer bekannten Menge an $HgCl_2$ (etwa $^1/_3$ der nach der Gleichung benötigten Menge) in Form einer 5%igen wäßrigen Lösung versetzt. Dann erfolgt der Zusatz einer berechneten Menge 5%iger Ammoniaklösung, welche ausreicht, um Eisen vollständig und Quecksilber teilweise als $HgNH_2Cl$ auszufällen. Der so erreichte p_H-Wert 7 (Bromthymolblau) ist solange konstant, als sich noch überschüssiges Hg in Lösung befindet (Prüfung anschließend im Filtrat mit $Na_2S_2O_4$). Der Niederschlag wird abfiltriert, mit 250 ml kaltem Wasser ausgewaschen, getrocknet und geglüht. Bei Aluminium ist das gleiche Verfahren anwendbar, jedoch sollte soviel Hg zugesetzt werden, als der Gleichung entspricht; außerdem setzt man 1,5 g NH_4Cl zu, um das Zusammenballen des Niederschlages zu beschleunigen. Zu beachten ist, daß

[1] Acta chem. scand. (Kopenhagen) **6**, 1066—1072 (1952). Univ. Technology, Kopenhagen, Dänemark.

[2] Analyt. Chemistry **24**, 1858 (1952). Wintrop-Stearns, Inc., Rensselaer. N.Y.

[3] Chemiker-Ztg. **47**, 557 (1923); **49**, 337 (1925); vgl. diese Z. **80**, 334 (1929).

[4] Anal. chim. Acta (Amsterdam) **7**, 304—307 (1952). Agricult. Fac., Univ. Belgrad, und Inst. Phys. Chem., Univ. Zagreb (Jugoslavien).

die Manganfällung im Filtrat in Gegenwart von Hg nicht wie gewöhnlich als $MnNH_4PO_4 \cdot H_2O$ erfolgen kann. — Aus beigefügten Beleganalysen ist ersichtlich, daß sich bei der Trennung von Fe/Al/Mn eine sehr befriedigende Genauigkeit ($\pm$ 2‰) erzielen läßt. H. Schmidt.

Zur Verwendung von Quecksilber(I)-nitrat als reduktometrischem Reagens[1] berichten R. Belcher und T. S. West[2] ergänzend, daß die *Eisen(III)-Bestimmung* in Gegenwart eines großen Überschusses an Rhodanid außer visuell auch potentiometrisch durchgeführt werden kann (Indicatorelektrode Platin, Vergleichselektrode Silber/Silberchlorid oder gesätt. Kalomelelektrode). Auf Grund der Beständigkeitskonstanten der Rhodanidkomplexe von Eisen(III) und Quecksilber(II) kann berechnet werden, daß die Reaktion quantitativ verlaufen muß. Das potentiometrische Verfahren ist besonders in Gegenwart von Metallen von Nutzen, welche, wie z. B. Co, Cr oder Bi, die visuelle Bestimmung stören. Molybdat stört auch das potentiometrische Verfahren, da es Eisen(II) in Gegenwart von Rhodanid oxydiert. Man kann *Molybdat* auf Grund dieser Oxydationswirkung in phosphorsaurer Lösung nach Zusatz eines Überschusses an Eisen(II)-sulfat und Rhodanid mit Quecksilber(I)-nitratlösung potentiometrisch titrieren. Das Potential ist aber unbeständig. — Versuche, Hydrochinon so zu bestimmen, daß man eine genau abgemessene überschüssige Menge $FeCl_3$-Lösung zusetzt und den unverbrauchten Rest mit $HgNO_3$-Lösung zurücktitriert, führten nicht zu einem brauchbaren Verfahren. H. Schmidt.

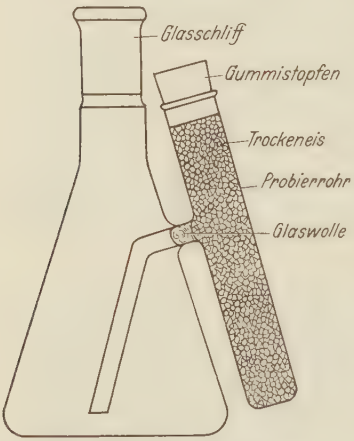


Abb. 1. Gerät zur Titration unter Schutzgas nach Myers und Fainer.

Eine einfache Flasche zu Titrationen unter einem Schutzgas beschreiben J. L. Myers und P. Fainer[3]. Ihr besonderer Vorzug besteht in der Umgehung des sonst gebräuchlichen langen und lästigen Gummischlauchs, der das Titriergefäß mit der Kohlensäurequelle verbindet. Das Gerät (Abb. 1) besteht aus einem konischen Kolben, längs dessen Seitenwand ein Probierrohr derart befestigt ist, daß ein angesetztes nach unten abgebogenes Glasrohr normaler Stärke, dicht durch die Seitenwand hindurch geführt, beide Gefäße miteinander verbindet. Das Probierrohr wird mit Trockeneis gefüllt. Die gasförmige Kohlensäure tritt dann durch die Flüssigkeit im Kolben über deren Oberfläche aus. Das Gerät ist nicht ortsgebunden, kann z. B. von einem Rückflußkühler abgenommen und in ein Abkühlwasserbecken eingetaucht werden. A. Schleicher.

Die Verwendung von kleinen Fläschchen mit besonderem Verschluß empfehlen D. M. Smith, J. Mitchell jr. und Annette M. Billmeyer[4] zum Gebrauch bei der Halbmikrobestimmung funktioneller Gruppen in organischen Verbindungen, z. B.

[1] Vgl. diese Z. **137**, 129 (1952/53); **138**, 118 (1953).

[2] Anal. chim. Acta (Amsterdam) **7**, 470—475 (1952). Univ. Birmingham (England).

[3] Analyt. Chemistry **24**, 1384 (1952). Armament Res., Developm. Establ., Quebec (Canada).

[4] Analyt. Chemistry **24**, 1847—1849 (1952). E. I. du Pont de Nemours & Co., Inc., Wilmington, Del. (USA).

bei der Titration von Säuren, Basen oder Estern. Die Fläschchen sind mit einem gelochten Gummistopfen verschlossen, über den eine 1 mm starke Gummimembran gezogen ist; die etwa 5 mm weite Halsöffnung des Fläschchens trägt schließlich noch eine entfernbare Schutzkappe. Bei der Entnahme aus dem 10 oder 25 ml fassenden Serumfläschchen durchstößt man die Membran mittels der feinen Nadel einer Injektionsspritze und titriert in gleicher Weise durch Zufügen der Maßflüssigkeit, wobei noch eine zweite Nadel zum Luftausgleich in die Membran eingestochen wird. Die Einstiche verursachen keinen merklichen Flüssigkeitsverlust durch Verdampfen, wie durch Gewichtskontrolle nach 4stündiger Erwärmung von Methanol im Wasserbad festgestellt wurde. Bei Titrationen wird nicht wie üblich die zugesetzte Menge Maßflüssigkeit volumetrisch bestimmt, sondern aus der Gewichtszunahme des Fläschcheninhalts auf einer Schnellwaage ermittelt. Neben den üblichen Titrationen von Säuren und Basen können auch Verseifungen von Estern vorgenommen werden, indem nach Zufügen von etwa 1 ml 2 n methanolischer Natronlauge $^1/_2$ Std im Wasserbad bei 60° C das Fläschchen mit Inhalt erhitzt und wie üblich weiter behandelt wird. Weitere Verwendungsmöglichkeiten sind die Benützung als Scheidetrichter; als Gaswäscher eignen sich Fläschchen mit Doppelhals oben und unten, gegebenenfalls mit einer in der Mitte befindlichen Sinterplatte; als Zentrifugiergefäß oder als Pyknometer benützt man Fläschchen mit längerem Hals und geeigneter Kalibrierung. H. Zellner.

IV. Spezielle analytische Methoden.

1. Auf Lebensmittel und Gesundheitspflege bezügliche.

Die colorimetrische Bestimmung von Zucker nach V. Maurandi[1] beruht auf der Reduktion der Pikrinsäure zur Pikraminsäure (Farbumschlag gelb nach rot). Die Inversion der Zuckerlösung erfolgt mit Salzsäure durch 5 min langes Erwärmen auf 60—65° C. — *Ausführung.* In einen getrockneten 100/110 ml-Meßkolben gibt man 8 ml einer 1%igen Pikrinsäurelösung, 1 ml einer wäßrigen, frisch bereiteten, 33%igen Acetonlösung, 1 ml n Natronlauge und endlich 100 ml der zu untersuchenden Zuckerlösung, die vorher mit Aluminiumhydroxydgel geklärt wird. Kalilauge und Ammoniak lassen sich an Stelle von Natronlauge nicht verwenden, weil sie wenig lösliche Salze bilden. Man erwärmt genau 30 min auf dem Wasserbade, kühlt auf Raumtemperatur ab und ergänzt das Volumen auf 110 ml. Eine entstehende weißliche Trübung geht beim Umschütteln in Lösung. Die klare Flüssigkeit photometriert man rasch mit Gelbfilter (585 mμ) und wertet an Hand einer Eichkurve aus. Gleichzeitig ist eine Blindprobe vorzubereiten, in der statt der Zuckerlösung die gleiche Menge Wasser zugefügt wird. Das Klärmittel stellt man durch Auflösen von 30 g Aluminiumsulfat in 1500 ml Wasser her, dem etwa 10 Tropfen Phenolphthalein zugesetzt worden waren. Man fügt Ammoniak bis zur Rosafärbung zu, läßt den Niederschlag absetzen, dekantiert ihn ab, löst ihn wieder auf und wiederholt die Fällung bis zum Verschwinden der Phenolphthaleinfärbung. Nach dem letzten Dekantieren ergänzt man das Volumen der Suspension auf 300 ml. Zum Klären verwendet man nicht mehr als 2—4 ml je Probe (einige Liter), um die Zuckerkonzentration nicht zu ändern. — Die als Konservierungsmittel der Zuckerlösung zugesetzte Salicylsäure stört die Bestimmung nicht. Die Methode gestattet, die Zerstörung der Saccharose und des Invertzuckers im Transportwasser durch Mikroorganismen zu verfolgen. K. Freytag.

[1] Industr. saccar. ital. **45**, 88—92 (1952). Lab. Sperim. S.P.Z., Ferrara (Italien).

Zur Bestimmung von organischen Bromverbindungen in Getränken empfiehlt J. A. C. VAN PINXTEREN[1] die Anwendung der KÖNIGschen Reaktion. Das Brom aus den organischen Verbindungen (Konservierungsmitteln) wird durch Oxydation mit Chromsäure in Gegenwart von Alkalicyanid in Bromcyan übergeführt und die aus diesem mit Pyridin entstehende rote Farbe wird gemessen. Man kann nach der unten angegebenen Arbeitsweise noch 1 mg Brom in 1 kg Getränk bestimmen, auch wenn dieses bis zu 100 mg Eosin enthält, was bei alkoholfreien Getränken vorkommt. 500 μg Chlorid beeinträchtigen die Bestimmung von 10 μg Bromid nicht, Jod-Ion stört garnicht. — *Ausführung.* 20 ml des von Kohlensäure durch Filtrieren befreiten Getränkes werden mit 5 ml 4 n Schwefelsäure angesäuert und 3mal mit je 25 ml Äther extrahiert. Aus dem über wasserfreiem Natriumsulfat getrockneten ätherischen Extrakt wird der Äther nach Versetzen mit 1 ml 0,5 n alkoholischer Kalilauge in einem 150 ml-CLAISEN-Kolben im Vakuum abgedunstet. Den Rückstand erhitzt man mit 0,1 g metallischem Natrium und 1 ml absolutem Äthanol unter Rückflußkühlung bis zur Lösung (3 min), fügt noch 3 ml Wasser zu und erhitzt erneut 3 min. Das Reaktionsgemisch ist in einer Pt-Schale zur Trockne zu bringen und anschließend bei bis 500° C zu glühen. Der Glührückstand wird in n Schwefelsäure gelöst, auf 25 ml aufgefüllt und filtriert. 2—5 ml des Filtrates erhitzt man im Gefäß *A* (Abb. 1) unter Durchleiten von Stickstoff auf 100° C (Wasserbad), nachdem man 3 ml 6,5%ige wäßrige KCN-Lösung und 2—5 ml Chromsäurelösung (150 g gelöst in 80 ml Wasser) zugesetzt hat. Das gebildete Bromcyan wird im Gefäß *B* in einer Mischung von 4 ml frisch bereiteter gesättigter Benzidinhydrochloridlösung, 1 ml Pyridin und 1 ml 96%igem Alkohol aufgefangen (Eiswasser als Kühlung!). Der Inhalt des Gefäßes *B* wird in einen Meßkolben übergeführt und nach dem Auswaschen mit 50%igem Alkohol auf 25 ml aufgefüllt. Die Extinktion der Lösung wird bei 500 mμ bestimmt. Die Bromkonzentration ist aus einer Eichkurve abzulesen, ein Blindversuch läuft nebenher.

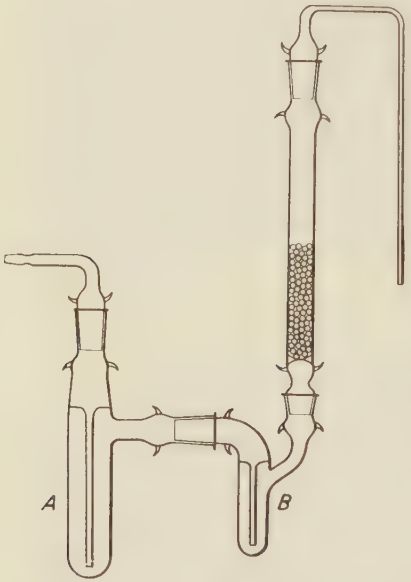


Abb. 1.
Extraktionsapparat nach VAN PINXTEREN.

J. KOCH.

Methoden zur Bestimmung kleinster Mengen Hexachlorcyclohexan (HCH) und DDT in Mehl und Brot geben H. ZEUMER und K. NEUHAUS[2] an. *Zur Bestimmung von HCH* benutzen sie das colorimetrische Verfahren von M. S. SCHECHTER und J. HORNSTEIN[3]. Für den vorliegenden Zweck mußte jedoch eine besondere Apparatur ausgearbeitet werden (Abb. 1, S. 207). In dieser dient zur Füllung des Kühlers

[1] Analyst (London) **77**, 367—372 (1952). Pharm. Lab., Rijks-Univ., Utrecht.

[2] Getreide und Mehl **3**, 57 (1953); Chemiker-Ztg. **1953**, 105. Biol. Bundesanst., Braunschweig.

[3] Analyt. Chemistry **24**, 544 (1952); vgl. diese Z. **139**, 307 (1953).

Chloroform an Stelle des Trichloräthylens der Originalmethode. Die Mehlproben, im allgemeinen 10 g, werden 1 Std im Soxhlet mit Chloroform extrahiert, und zwar im Kolben der Reaktionsapparatur. Das Chloroform wird bis auf wenige ml abdestilliert und der Rückstand mit 25 ml Eisessig versetzt. Dann wird *tropfenweise* weiterdestilliert, bis 116° C erreicht sind. Bei der anschließenden Reaktion nach SCHECHTER und HORNSTEIN wird in der neuen Apparatur nur 45 min auf 120 bis 125° C erhitzt, dann 25 min bei 140–145° C gehalten und schließlich innerhalb 5 min auf 150° C, höchstens 155° C erhitzt. — *Für die Bestimmung von DDT* verwenden die Autoren das colorimetrische Verfahren von M. S. SCHECHTER, S. B. SOLOWAY, R. A. HAYES und H. L. HALLER[1] Störende Begleitstoffe aus dem Mehl müssen hierbei aber sorgfältig durch Adsorption entfernt werden. Die Mehlproben, normalerweise 10 g, jedenfalls zwischen 10 und 70 μg DDT enthaltend, werden 4 Std im Soxhlet mit Petroläther extrahiert, dann wird auf 30—40 ml eingeengt. In ein Adsorptionsrohr, unten mit Hahn, führt man zunächst einen Wattebausch (Watte 4 Std mit Aceton extrahiert und bei 105° C getrocknet), füllt dann bei geschlossenem Hahn 15 cm hoch Petroläther ein und schließlich Aluminiumoxyd nach BROCKMANN bis zur Schichthöhe von 7 cm. Der Petroläther wird abgelassen, bis er nur noch 0,5 cm über dem Aluminiumoxyd steht. Den Petrolätherextrakt läßt man nun während mindestens 20 min durchlaufen, wäscht den Extraktionskolben mit 80 ml Petroläther in 4—5 Anteilen und läßt diesen Petroläther während mindestens 25 min durchlaufen. Alles Durchgelaufene wird vereinigt, eingeengt und in einem Reagensglas völlig von Petroläther befreit. Hierauf wird nitriert und im wesentlichen nach SCHECHTER und Mitarb. weiter verfahren. — Nach vorstehenden Methoden wurden in 10 g Mehl von 30 μg HCH im Mittel 29 μg, von 50 μg DDT im Mittel 48 μg wiedergefunden.

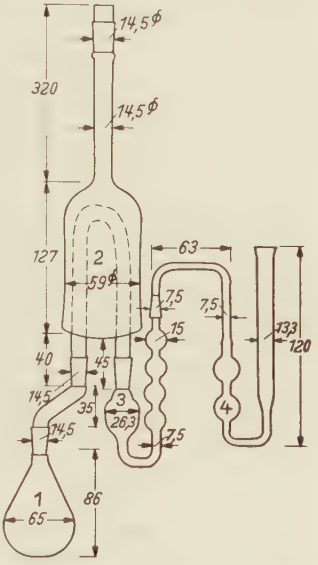


Abb. 2. Apparat zur Bestimmung von Hexachlorcyclohexan nach ZEUMER und NEUHAUS.

W. FISCHER.

2. Auf Handel, Industrie und Landwirtschaft bezügliche Methoden.

Literatur. C. ZERBE. *Mineralöle und verwandte Produkte. Ein Handbuch für das Laboratorium.* 1575 Seiten mit 467 Abbildungen und einer Tafel. Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg 1952. Preis Ganzleinen DM 192.—.

Unter Mitarbeit zahlreicher Fachleute ist hier ein Werk entstanden, das bestimmt ist, an die Stelle des klassischen, aber heute an vielen Stellen veralteten Laboratoriumsbuches von HOLDE zu treten. Das ungeheure Anwachsen des Stoffgebietes in den letzten Jahrzehnten machte eine Unterteilung in die Mineralöle und verwandten Produkte einerseits und in die Fette und fetten Öle andrerseits notwendig.

[1] Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **17**, 704 (1945); vgl. diese Z. **131**, 323 (1950).

Die letzten sind in dem vorliegenden Werk nur kurz erwähnt und sollen später ausführlich behandelt werden. Das vorliegende Werk beschäftigt sich nach Besprechung der allgemeinen Methoden im I. Kapitel mit den Untersuchungsmethoden von Erdöl und Erdölprodukten, Kraftstoffen, Schmierstoffen, Braunkohlenteer, Steinkohlenteer, Schieferölen und Torfteer. Es folgen die Druckhydrierung und die Fischer-Tropsch-Synthese, bei welcher die Behandlung der technologischen Seite vielleicht etwas über den für ein Laboratoriumsbuch notwendigen Rahmen hinausgeht. Den Abschluß des Werkes bilden kürzere Abschnitte über die Untersuchungsmethoden von Erdwachs, Ceresin, Montanwachs, über Öle und Fette aus Pflanzen und Tierkörpern, Harze, Terpentinölprodukte und Wachse. Die Abgrenzungen sind nicht eng gezogen. So finden zahlreiche Spezialöle bis hin zu den pharmazeutisch-kosmetisch verwendeten Berücksichtigung und — sehr zu begrüßen — auch so ganz anders geartete Öle wie die hydraulischen Bremsflüssigkeiten mit den U.S.-Army-Anforderungen, leider jedoch nicht mit den letzten Änderungen dieser Vorschriften. Bedauerlich ist, daß hier keine deutschen Vorschriften bestehen, die den bei uns gebräuchlichen, meist ricinusölfreien, diäthylenglykolätherhaltigen Mischungen gerecht werden, die auch leider nicht erwähnt werden. — Wenn man den gegenüber dem „Holde" außerordentlich vermehrten Umfang betrachtet, muß man bedauern, daß es noch nicht zu einer kritischen Sichtung und Normung auf übernationaler Basis gekommen ist, die das Nebeneinander so vieler Methoden beseitigen könnte. Sachregister und Inhaltsverzeichnis des Werkes sind ausführlich und gut, so daß jedes gewünschte Untersuchungsverfahren zuverlässig aufgefunden werden kann. Sehr wertvoll sind auch die Verzeichnisse der DIN-, österreichischen, ASTM- und IP-Vorschriften. Zahlreiche Literaturzitate erhöhen noch den Wert des Buches, doch sind die Untersuchungsverfahren so ausführlich wiedergegeben, daß sich das Nachschlagen der Originalliteratur meist erübrigt. In dem Werk liegt ein Laboratoriumshandbuch vor, das für jedes auf diesem Gebiet arbeitende Institut unentbehrlich ist. O. Sauter.

F. Specht: *Quantitative anorganische Analyse in der Technik. Untersuchungsmethoden für eine Auswahl anorganisch-technischer Produkte.* 236 Seiten. Verlag Chemie GmbH., Weinheim (Bergstr.) 1953. Ganzleinen DM 17.80.

Mit vorliegender Zusammenstellung erprobter Methoden zur Analyse technisch wichtiger Stoffe hat F. Specht ein Werk veröffentlicht, das nicht nur dem analytisch arbeitenden Chemiker, sondern auch dem Chemotechniker und Laboranten zahlreiche Hinweise gibt und praktische Erfahrungen vermittelt. Die Einleitung befaßt sich mit Fragen der Probenahme und Bemusterung, ein Anhang gibt Vorschriften für die Herstellung von Normallösungen sowie für die Aufarbeitung von Jod-, Silber- und Molybdänrückständen. Der in 13 Kapitel unterteilte Hauptteil beschreibt die Untersuchung mannigfacher, technisch wichtiger Stoffe, Rohmaterialien und Fertigprodukte; es seien nur herausgegriffen: Natronlauge, Oleum und andere Säuren von technischer Bedeutung, Chromgerbstoffe, Emailfritten und -farbstoffe, Flußspat und Fluoride, Chlorgas, Guanidinnitrat usf. Das letzte Kapitel bringt Arbeitsvorschriften für die photometrische Bestimmung einiger wichtiger Metalle samt Extinktionskurven. Man muß dem Verfasser dankbar sein, daß er seine umfassenden Kenntnisse auf dem Gebiet der technischen Analyse und die vielfältigen praktischen Erfahrungen, die sich bei der Leitung eines großen Industrielaboratoriums (Farbenfabriken Bayer, Leverkusen) ergeben, Interessenten zugänglich gemacht hat.

Roland S. Young: *Industrial inorganic analysis.* VIII, 368 Seiten mit 12 Abbildungen. Verlag Chapman & Hall Ltd., London 1953. Preis 36 Schilling.

Das vorliegende Werk entstand aus Notizen des Verfassers über Analysengänge, besondere Methoden und sonstige bei jahrelanger Arbeit gesammelte Erfahrungen.

Die Bekanntgabe an weitere Kreise soll vor allem den jungen Chemikern in der Metall-, Hütten- und sonstigen chemischen Industrie von Nutzen sein; dem noch Studierenden will das Buch die Kenntnis der Grundsätze praktischen Arbeitens in der Industrie vermitteln. Der Inhalt des Buches ist alphabetisch geordnet nach den 45 behandelten Elementen, die Platingruppe, Kalium und Natrium, Niob und Tantal, Selen und Tellur sind als je *ein* Kapitel gefaßt. Ein Anhang bringt ausgewählte Methoden besonderer Art, z. B. die Bestimmung des Säuregehaltes von Transformatorenölen, die Trink- und Gebrauchswasseruntersuchung. Bei der Härtebestimmung wird auch die von SCHWARZENBACH eingeführte Komplexonmethode kurz beschrieben. Den Abschluß bilden Vorschriften für die Herstellung von Standardlösungen für die Acidimetrie und Alkalimetrie. Das 71 Namen fassende Literaturregister berücksichtigt nur in England und den Vereinigten Staaten herausgegebene Werke und Veröffentlichungen. Wertvoll sind besonders die den einzelnen Kapiteln beigefügten Abschnitte „special procedures". So finden sich im Fluorkapitel, um ein Beispiel zu nennen, Hinweise auf die Bestimmung von Natriumsilicofluorid in Holzkonservierungsmitteln, auf Untersuchung von gasförmigem Fluor und auf die Fluorbestimmung in organischen Verbindungen. Die Bestimmung von Fluor in Nahrungsmitteln und Wasser wird, als von grundsätzlicher Bedeutung für alle Substanzen mit geringem Fluorgehalt, genau beschrieben. Als kennzeichnend für das Werk sei ferner angeführt, daß beim Kapitel „Bor" eine genaue Vorschrift für die Bestimmung geringster Mengen besonders in Stahl (nach T. R. CUNNINGHAM) mit detaillierter Skizze der verwendeten Spezialapparatur gegeben wird. Die den einzelnen Kapiteln angeschlossenen Literaturangaben erstrecken sich bis auf das Jahr 1953; sie beziehen sich zum Teil auf sehr kompetente Autoren der einzelnen Fachgebiete. Das Buch ist nach Meinung des Referenten eine sehr wertvolle Bereicherung der bisher erschienenen analytischen Fachliteratur. A. EICHLER.

K. THINIUS: *Anleitung zur Analyse der Lösungsmittel.* 86 Seiten und 7 Abbildungen im Text. Verlag Johann Ambrosius Barth, Leipzig 1953. Preis brosch. DM 4.50.

Die Frage der Lösungsmittel gewinnt in der heutigen Industrie für Herstellungsverfahren und aus hygienischen Gründen immer mehr Bedeutung und damit besteht auch ein steigendes Bedürfnis nach entsprechenden Analysenverfahren. Die vorliegende Anleitung trägt dem durch eingehende Beschreibung der physikalischen und chemischen Bestimmungsmethoden einfacher und gemischter Lösungsmittel (Verdünnungsmittel, Verschnittmittel) Rechnung. In die Betrachtung einbezogen sind auch die flüchtigen Komponenten von technisch genutzten Auflösungen irgendwelcher Stoffe oder Stoffgemische. Bei den beschriebenen Verfahren handelt es sich in den ersten Kapiteln um physikalische und chemische Voruntersuchungen. Den Hauptteil des Werkes nehmen die Methoden zum qualitativen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgruppen ein. Sie sind eingeteilt in Kohlenwasserstoffe, Terpentinöl und seine Austauschprodukte, Chlorkohlenwasserstoffe, Ketone, Ester, Äther und Acetale, Alkohole. Ergänzt wird das Werk durch eine Tabelle, die Angaben über Siedepunkt, Dichte, Brechungsindex, Viskosität und Flammpunkt von häufig verwendeten Lösungsmitteln enthält. Die Literatur ist bis in die neueste Zeit berücksichtigt. Das kleine Werk wird von allen gern benutzt werden, die mit einschlägigen Untersuchungen zu tun haben. H. KURTENACKER.

Zur colorimetrischen Borbestimmung in Pflanzenmaterial und Böden verwendet A. KRUGER[1] die Farbreaktion mit einem acetylierten Chinalizarinreagens, das hergestellt wird, indem man der Lösung von 20 mg Chinalizarin in 750 ml konz.

[1] J. South African. chem. Inst. (N.S.) **4**, 109—114 (1951). Chem. Services, Dept. Agriculture, Pretoria.

Schwefelsäure vorsichtig 250 ml Eisessig zufügt und kühlt. Das Reagens ist gut verschlossen aufzubewahren (Reagens A). — *Ausführung.* Man erhitzt 0,1 g *Pflanzenmaterial* in einem alkalibeständigen Reagensglas (20 × 100 mm) mit 2 ml konz. Schwefelsäure und 2—3 Tr. Perhydrol 30 min lang bei 90° C und wiederholt dies so oft, bis die Lösung farblos geworden ist. Nach dem Abkühlen fügt man 10 ml Reagens A zu und mißt nach 40 min gegen einen Blindansatz die blaue Färbung bei 640 mμ. Die Eichkurve wird mit steigenden Mengen Borsäuretestlösung (10 μg B/ml) aufgestellt und reicht von 0—10 μg B/10 ml. Die Abnahmen werden in alkalifesten Reagensgläsern mit 1 ml gesättigter $Ca(OH)_2$-Lösung bei 125° C eingedampft und dann wie beschrieben behandelt. Zur *Bestimmung der löslichen Borsäure in Bodenproben* erhitzt man 25 g lufttrockene Probe in alkalifesten Kölbchen mit 50 ml Wasser 5 min lang unter Rückfluß. Dann fügt man nach dem Abkühlen zur leichteren Klärung 1 ml gesättigte $Ca(OH)_2$-Lösung zu und zentrifugiert. Danach dampft man die 10 ml-Abnahme bis zur Trockne, zerstört durch H_2SO_4 H_2O_2-Behandlung die organische Substanz und bestimmt den Borgehalt wie angegeben. Den *Gesamtborgehalt* ermittelt man aus einer 1 g-Einwaage durch Aufschluß mit 6 g Na_2CO_3, den man mit etwa 40—50 ml 5 n Schwefelsäure auslaugt. Man füllt mit Alkohol auf 250 ml auf, entnimmt nach dem Auffüllen und Durchmischen 10 ml, mit denen wie bereits beschrieben nach Zerstörung der organischen Substanz die Messung durchgeführt wird. Wenn Proben vorliegen, in denen keine organischen Substanzen enthalten sind, arbeitet man mit 1 ml Abnahmen direkt und versetzt mit 10 ml Reagenslösung B, die wie Reagens A hergestellt wird, aber an Stelle von 750 ml Schwefelsäure 550 ml konz. Schwefelsäure + 200 ml Oleum (15—20% SO_3) enthält. Man stellt die Absorption nach 60 min gegen einen Blindansatz fest. Die Eichkurve wird unter den gleichen Bedingungen aufgestellt.

Germaniumsäure gibt eine ähnliche Reaktion wie Borsäure. Oxydierende Substanzen müssen vorher entfernt werden. Eine Verminderung der Reagenskonzentration auf 0,0005% setzt den Meßbereich auf 30 μg 10 ml herab. Das Verhältnis von Schwefelsäure zu Essigsäure kann zwischen 80 20 und 70 30% schwanken, ohne die Meßwerte zu beeinflussen. Durch Erwärmen der Meßlösung auf 60° C und wieder Abkühlen, kann die Wartezeit zur Erreichung des Farbmaximums verkürzt werden. Das Maximum wird bei Verfahren A nach 40 min, bei B erst nach 60 min erreicht. Die Färbung ist dann für 24 Std konstant. Wenn Spuren Wasserstoffperoxyd in der Lösung verblieben sind, ist es ratsam, die Messung sofort nach Erreichung des Farbmaximums vorzunehmen. Beleganalysen und Angaben über Analysenfehler wurden nicht gebracht. H. Pohl.

Zur Bestimmung der Phosphorsäureverbindungen in Baumwollsaat verwenden W. A. Pons jr., M. F. Stansbury und C. L. Hoffpauir[1] die von H. W. Gerritz[2] modifizierte colorimetrische Methode von C. Zinzadze[3] (Methode I), in Verbindung mit der colorimetrischen Methode von W. A. Pons jr. und J. D. Guthrie[4] (Methode II). — *Die Gesamtphosphorsäure* wird nach der feuchten Veraschung mittels Schwefelsäure und Wasserstoffperoxyd nach Meth. I bestimmt. *Die anorganische Phosphorsäure* wird aus dem mit Petroläther entfetteten Rückstand, welcher nach Trocknung wiederum mit 0,75 n Trichloressigsäure extrahiert wird, nach Meth. II bestimmt. *Die Bestimmung des säurelöslichen Phosphors,* in welchem Phytin, anorganischer Phosphor und Phosphorsäurekohlenhydratester enthalten sind, erfolgt

[1] J. Assoc. off. agric. Chemists **36**, 492—504 (1953). South. region. Res. Lab., New Orleans, La. (USA).

[2] J. Assoc. off. agric. Chemists **23**, 321 (1940).

[3] Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **7**, 227 (1935).

[4] Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **18**, 184 (1946).

aus dem Trichloressigsäureextrakt nach Meth. I. *Die Phosphatid- und Phytinphosphorsäure* werden aus einem Benzol-Alkoholextrakt erfaßt, und zwar die Phosphatide nach Veraschung im Muffelofen mit Magnesiumnitrat nach Meth. II und das Phytin nach weiterer Extraktion des Benzol-Alkoholextraktes mit 2%iger Salzsäure, Neutralisation mit Natronlauge und Überführung des Phytins in Ferriphytat nach Meth. I. *Die Nucleinphosphorsäure* wird aus dem Wert für Gesamtphosphorsäure berechnet, indem die Werte des säurelöslichen Phosphors und die der Phosphatide abgezogen werden. *Die Kohlenhydratesterphosphorsäure* wird durch Subtraktion der Werte für Phytin und anorganischem Phosphor von dem säurelöslichen Phosphor berechnet.

Die Prüfanalysen zeigen hinreichende Genauigkeit, so daß das analytische System für die Bestimmung der Phosphorsäurefraktionen in Pflanzen brauchbar ist.

W. Grütz.

Zur Bestimmung von Molybdänspuren in Silicatgesteinen beschreiben R. B. Henrickson und E. B. Sandell[1] ein Anreicherungsverfahren, bei welchem das Molybdän zunächst unter Verwendung von Antimon(V) als Sammler mit Schwefelwasserstoff gefällt und dann nach Lösen des Niederschlages in Lauge als Rhodanid photometrisch bestimmt wird. Das Verfahren eignet sich besonders in Gegenwart von verhältnismäßig viel Wolfram zur Molybdänbestimmung. Einige Zehntel μg Mo in 1 g Probe können auf diese Art genau erfaßt werden. Phosphat, Vanadat, Wolframat, Niob, Platin aus dem Tiegelmaterial usw. stören nicht. — *Ausführung.* Man löst die Schmelze von 0,5 g Probe mit 3 g Na_2CO_3 in heißem Wasser unter Zusatz einiger Tropfen Alkohol, filtriert, wäscht heiß und versetzt das etwa 75 ml betragende Filtrat nach dem Erkalten mit 0,5 g Weinsäure, wenn W zugegen ist. Hierauf läßt man rasch 10 ml konz. Salzsäure zufließen, fügt 0,2 ml 0,5%ige $SbCl_5$-Lösung zu, sättigt bei Raumtemperatur mit H_2S, erhitzt dann unter weiterem Durchleiten zum Sieden und läßt über Nacht stehen. Man filtriert in einen Porzellanfiltertiegel, wäscht 3—4mal mit 0,5 ml-Anteilen von n Salzsäure, dann mit 0,5 ml Wasser und löst den Niederschlag in 1 ml n Natronlauge. Nach Zugabe von 2 ml gesättigtem Bromwasser erhitzt man auf 80—90° C, neutralisiert mit Salzsäure und fügt 1,5 ml konz. Salzsäure im Überschuß zu. Man überführt in einen Scheidetrichter, versetzt mit 0,2 ml 1%iger Eisen(II)-ammoniumsulfatlösung in 0,2 n Schwefelsäure, 0,5 ml 10%iger KSCN-Lösung und 0,5 ml 10%iger $SnCl_2 \cdot 2H_2O$-Lösung in n Salzsäure, schüttelt mit 5 ml Isopropyläther aus und mißt die Farbintensität der organischen Lösung bei 460—475 mμ. Ein Blindversuch ist auszuführen. Die Eichkurve wird mit Molybdäntestlösung (1 ml = 100 μg Mo) von 0—30 μg Mo/ml unter den gleichen Bedingungen aufgestellt. H. Pohl.

Die Bestimmung von Schwefel in Petroleumdestillaten mit Hilfe der Röntgenstrahlenabsorption[2] verbessern A. Y. Mottlau und C. E. Driesens jr.[3], indem sie das mit Geigerzähler ausgerüstete Röntgenspektrometer durch das Röntgenphotometer der General Electric Company, das als Zweistrahlinstrument wesentlich genauer arbeitet, ersetzen. Das Prinzip des von ihnen angewandten Verfahrens ist folgendes. Man bringt in das eine der beiden Röntgenstrahlbündel eine 3,5 cm starke Polystyrolplatte, in das zweite Strahlbündel in einer Aluminiumküvette, die nach Art eines Heiner-Zylinders angeordnet ist, 85,0 g des zu prüfenden Petroleumdestillates und gleicht die unterschiedliche Absorption — im Vergleichsstrahlen-

[1] Anal. chim. Acta (Amsterdam) **7**, 57–62 (1952). Univ. Minneapolis, Minn. (USA).

[2] Vgl. S. W. Levine und A. H. Okamoto: Analyt. Chemistry **23**, 699 (1951); vgl. diese Z. **136**, 391 (1952).

[3] Analyt. Chemistry **24**, 1852–1854 (1952). Standard Oil Developm. Co., Esso Lab., Linden, N. J. (USA).

gang schwächen nur die C- und H-Atome des Kohlenwasserstoffs Polystyrol, im Meßstrahlengang hingegen außer C- und H-Atomen auch die S-Atome der schwefelhaltigen Proben — mit Hilfe der Meßeinrichtung des Photometers aus. Bei passender Wahl der Betriebsspannung des Röntgenrohres, das kontinuierliche Röntgenstrahlung liefert, konstanter, mittels eines Spannungsreglers stabilisierter Netzspannung und sorgfältiger Eichung mit Standardproben sollen sich die Schwefelgehalte von Petroleumprodukten (0,12—0,75%) röntgenphotometrisch auf ± 0,02 bis 0,04% S genau bestimmen lassen. Die Zahl der von einer Arbeitskraft je Arbeitstag durchführbaren Analysen wird mit 30—40, entsprechend 10—15 Mannminuten angegeben. W. Schuhknecht.

In Schieferöl (Colorado) konnten R. A. van Meter, C. W. Bailey, J. R. Smith, R. T. Moore, C. S. Allbright, I. A. Jacobson jr., V. M. Hylton und J. S. Ball[1] folgende *sauerstoff- und stickstoffhaltige Verbindungen* identifizieren: 11 Phenole, 16 Pyridine, 2 Pyrrole, 3 Benzonitrile und Benzofuran. Das Öl (Siedebereich bis 200° C) wurde mit wäßrigen Laugen oder Säuren extrahiert, die freien organischen Säuren oder Basen regeneriert, die Gemische nach der Trennung fraktioniert destilliert. Jede Fraktion wurde physikalisch und chemisch untersucht (Dichten, Brechungsindices, Schmelzpunkte, UV-, Infrarot- und Massenspektrometrie). H. Freytag.

Einen verbesserten Permanganat-Zeit-Test zur Äthylalkohol-Qualitätskontrolle geben F. T. Weiss und E. D. Peters[2] an. Dabei wird die Abnahme der Permanganatfarbe nach Zugabe zum zu prüfenden Alkohol infolge Oxydation von Verunreinigungen mit der Zeit verfolgt, und der Endpunkt als Farbgleichheit mit einer Standardlösung festgelegt. Diese Standardlösung enthält in 50 ml 5 ml einer Lösung von 50 g $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ im Liter sowie 7 ml einer Lösung von 40 g $UO_2(NO_3)_2 \cdot 6\ H_2O$ im Liter. Da die Zeit bis zur Farbgleichheit stark von der Temperatur abhängt, haben Verf. eine Temperatur 15° C ± 0,2° C für die Ausführung des Testes festgelegt. — *Ausführung.* In eine im Original näher beschriebene Vorrichtung, die eine Beleuchtung der Proberöhrchen von unten gestattet, setzt man die 50 ml fassenden Proberöhrchen, die mit 50 ml des zu untersuchenden Alkohols bzw. mit 50 ml der Standardlösung gefüllt sind. Nachdem alles für 15 min in einem Bad von 15° C ± 0,2° C gestanden hat, gibt man zum Alkohol 2 ml einer frisch bereiteten 0,02%-igen $KMnO_4$-Lösung. Nun bestimmt man mindestens alle 30 sec, ob schon Farbgleichheit mit der Standardlösung eingetreten ist. Die Genauigkeit beträgt ± 1 min. Der Einfluß des Wassergehaltes von 6—60 Gew.% wird im Original beschrieben. Die Permanganat-Zeit geht bei 20% durch ein Maximum und sinkt bis 60% auf etwa die Hälfte des Wertes ab. K. Brodersen.

Um Triäthylenglykol aus seinen Mischungen mit Wasser und Glycerin zu isolieren und quantitativ zu bestimmen, haben P. Chavanne und H. Marie[3] im Chloroform ein Lösungsmittel gefunden, das mit Triäthylenglykol, aber nicht mit Wasser und Glycerin mischbar ist. Allerdings verhindert die Anwesenheit von Wasser und Glycerin die Extraktion des Triäthylenglykols durch Chloroform. Gibt man aber bis zur Sättigung Kaliumcarbonat zu der Mischung, so läßt sich das Triäthylenglykol leicht quantitativ extrahieren. 10—15 ml Mischung mit 15—60% Triäthylenglykol schüttelt man beispielsweise nach dem Sättigen mit Kaliumcarbonat nacheinander mit 20 und 2mal mit 10 ml oder (bei hohem Triäthylenglykolgehalt) mit 30 und 2mal mit 15 ml Chloroform aus, verdampft bei 80° C das

[1] Analyt. Chemistry **24**, 1758—1763 (1952). Bur. of mines, Laramie, Wyo. (USA).

[2] Analyt. Chemistry **24**, 1658—1660 (1952). Shell Developm. Co., Emeryville, Calif.

[3] Ann. Falsificat. Fraudes **45**, 426—429 (1952). Service de Santé, Val-de-Grâce (Frankreich).

Lösungsmittel in trockener Luft (weil Triäthylenglykol hygroskopisch ist) und wägt den Rückstand, dessen Reinheit man noch durch Bestimmung des Brechungsindexes ($n_D^{14,5}$ 1,4576) prüfen kann. Die Fehlergrenze beträgt ± 2%. — Man kann auch das Flüssigkeitsgemisch in einer Reibschale mit soviel Kaliumcarbonat vermengen, daß eine krümelige Masse entsteht, benötigt dann aber erheblich mehr Kaliumcarbonat und Chloroform zum Extrahieren. F. Neumann.

Bei der quantitativen Bestimmung von Furfurylidenaceton werden nach A. G. Serebrennikova[1] in einen 250 ml-Erlenmeyer-Kolben 10 ml 0,4%ige Furfurylidenacetonlösung und 15–20 ml 2 n Natronlauge gebracht. Man schüttelt 10 min, gibt unter Schwenken 50 ml 0,1 n Jodlösung zu, läßt 10 min stehen, fügt dann 15 bis 20 ml 2 n Schwefelsäure zu und titriert den Jodüberschuß mit 0,1 n Thiosulfatlösung in Gegenwart von Stärke zurück. 6 ml 0,1 n Jodlösung entsprechen 0,036 g Furfurylidenaceton. Die quantitative Bestimmung in technischen Produkten erfolgt nach Abtrennung der Nebenprodukte. Man löst 0,5–1,0 g Produkt in 500 ml 60° C warmen Wasser und filtriert nach dem Abkühlen den harzigen Rückstand ab. Das Filtrat ist klar, schwach strohgelb gefärbt. Es wird gezeigt, daß chemisch reines Furfurylidenaceton mit Schwefelsäure kein gefärbtes Produkt gibt; die Verfärbung der Lösung wird nur durch die Nebenprodukte der Reaktion hervorgerufen. — Die Herstellung von Furfurylidenaceton wird beschrieben. A. Trofimow.

Die colorimetrische Pektinbestimmung mit Carbazol nach S. M. Stark jr.[2] haben Elizabeth A. McComb und R. M. McCready[3] hinsichtlich Abänderung der Reaktionsbedingungen näher untersucht. Als Eichsubstanz diente analysenreines Galacturonsäuremonohydrat. Bei Pektinstoffen wurde folgende Arbeitsweise angewendet. Um Methylestergruppen zu verseifen, hält man die zu untersuchende, möglichst zuckerfreie Probe in etwa 0,1%iger Konzentration 30 min bei 25–30° C in 0,05 n Natronlauge und verdünnt danach auf eine Konzentration von 0,002%. Zur Pektinbestimmung füllt man in ein Kulturröhrchen von 2,5 × 20 cm 12 ml konzentrierte Schwefelsäure, kühlt auf ungefähr 3° C, fügt 2 ml Analysenlösung (mit 5—80 μg Galacturonid) hinzu, kühlt zunächst unter 5° C und erhitzt dann 10 min in siedendem Wasser, kühlt wieder auf 20° C, gibt 1 ml einer 0,15%igen Lösung von Carbazol in 95%igem Alkohol hinzu, läßt 25 min bei Raumtemperatur zur Entwicklung der Farbe stehen und mißt die Absorption (Maximum bei 525 mμ). Die Ergebnisse sind auf 2% reproduzierbar. — Die als Reagens verwendete Schwefelsäure muß mindestens 95%ig sein; mit Verringerung ihrer Konzentration nimmt die Intensität der Färbung mit Carbazol schnell ab. — Von unter 5 bis über 30 min Erhitzungsdauer erhält man gleiche Ergebnisse. Nach dem Abkühlen kann man außerdem die Ansätze tagelang stehen lassen, bevor man das Carbazolreagens hinzufügt, ohne daß die Ergebnisse sich ändern. — Die maximale Farbintensität ist weitgehend unabhängig von der Carbazolkonzentration. Das Maximum wird mit steigender Konzentration früher erreicht, andererseits beginnt die Färbung aber auch früher wieder zu verblassen. — Führt man die Bestimmung ohne vorherige Abspaltung von Methylestergruppen durch, so erhält man um 10–20% zu niedrige Werte. — Glucuronsäure ergibt eine noch stärkere Färbung mit Carbazol als Galacturonsäure, kommt aber in Pektinen kaum vor. Mannuronsäure (z. B. in Alginsäure) dagegen reagiert unter den Analysenbedingungen nur schwach. Die häufigsten Zuckerarten und organischen Säuren stören die Pektinbestimmung erst bei größerem Überschuß. — Die Carbazolmethode erzielt mit der Titration der Carboxyl-

[1] Ž. prikl. Chim. **25**, 1238—1240 (1952).

[2] Analyt. Chemistry **22**, 1158 (1950); vgl. diese Z. **133**, 316 (1951).

[3] Analyt. Chemistry **24**, 1630—1632 (1952). West. Region. Res. Lab., Albany, Calif.

gruppen und mit der CO_2-Abspaltung und -Bestimmung leidlich gut übereinstimmende Ergebnisse, wogegen die Pektinbestimmung über die Calciumverbindung stärker abweicht. F. Neumann.

Für den quantitativen Nachweis von Pyrethrin in Belägen präparierter Papierbeutel und Kartonagen benutzen F. I. Edwards und C. Cueto[1] eine von K. A. Lord[2] beschriebene Farbreaktion. Durch Behandlung von extrahiertem Pyrethrin mit Hydroxylamin entsteht Hydroxamsäure, die nach Umsetzung mit Eisen(III)-chlorid unter innerer Komplexbildung in eine gefärbte, im Colorimeter meßbare Verbindung übergeht. — *Aufstellung der Eichkurve.* Zur Herstellung der Standardlösung löst man 100 mg eines 20%igen Pyrethrinkonzentrats in 1000 ml Äthylalkohol. Das Konzentrat soll Pyrethrin I und Pyrethrin II im Verhältnis 1,16 ±0,1 zu 1 enthalten[3]. Von der Standardlösung pipettiert man aliquote Teile in der Größenordnung von 5—30 ml, entsprechend 0,5—3,0 mg Pyrethrin, in einzelne Scheidetrichter von 500 ml Inhalt und fügt Äthylalkohol bis zu einem Volumen von jeweils 50 ml hinzu. Die alkoholische Lösung versetzt man mit 350 ml dest. Wasser, 15 ml Petroläther (Kp 30—60° C, Skellysolve F) und 7 g Natriumchlorid, schüttelt 1 min und überführt nach der Scheidung die wäßrige Schicht in einen zweiten Scheidetrichter. Die Extraktion wird danach ein zweites und drittes Mal mit je 10 ml Petroläther durchgeführt. Die vereinigten Extrakte werden einmal mit 5 ml Wasser gewaschen und durch einen mit Petroläther befeuchteten Wattebausch in einen Meßkolben von 50 ml Inhalt filtriert. Man dampft nun das Lösungsmittel ab, indem man bei 25° C über die Flüssigkeitsoberfläche einen Stickstoffstrom leitet. Den Rückstand im Kolben löst man in 3 ml Äthylalkohol und fügt 6 ml eines frisch bereiteten Gemisches gleicher Volumenteile 2 m Hydroxylaminhydrochloridlösung und 3,5 n Natronlauge hinzu. Unter zeitweisem Schütteln läßt man die Mischung genau 10 min bei einer Temperatur von 25° ± 5° C stehen, versetzt dann unter Schütteln mit 3 ml 4 n Salzsäure, 3 ml frischer Eisen(III)-chloridlösung (0,37 molar in 0,1 n Salzsäure) und 0,2—0,4 g Hyflo Super-Cel (Kieselgur) und filtriert die Lösung direkt in die Küvette des Colorimeters. Genau 10 min nach Zusatz der $FeCl_3$-Lösung photometriert man mit Grünfilter bei 540 mμ. Unter den gleichen Versuchsbedingungen führt man einen Blindversuch durch. *Bestimmung des Pyrethringehaltes.* Die zu untersuchende Papierprobe schneidet man in Streifen von etwa 15 cm Länge und 0,7 cm Breite und bringt diese aufrecht stehend in einem nach Art eines Perforators konstruierten Extraktionsapparat (vgl. Abb. 1). Die Einwaage soll so bemessen sein, daß der alkoholische Extrakt 1—3 mg Pyrethrin enthält. Extraktor und Rundkolben beschickt man mit 95%igem Äthylalkohol. Während der Extraktor in einem Wasserbad auf 80 –85° C erwärmt wird, befindet sich der Rund-

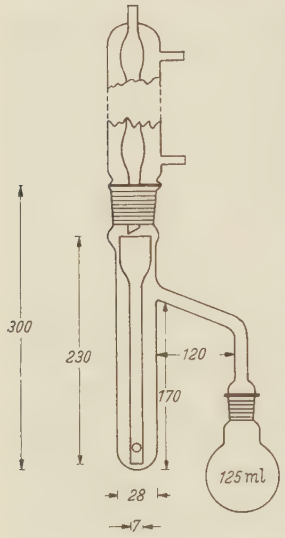


Abb. 1. Extraktionsapparat nach Edwards u. Cueto (Maße in mm).

[1] Analyt. Chemistry **24**, 1357—1359 (1952). Bur. of Entomology and Plant Quarantine, U. S. Dep. Agricult., Beltsville, Md.

[2] Nature (London) **165**, 567 (1950).

[3] Assoc. Offic. Agr. Chemists: Methods of Analysis. 7th ed., Method 5: 114. Washington, D. C., 1950.

kolben in einem auf 100—120° C erhitzten Metall- oder Ölbad. Die Dauer der Extraktion beträgt 3 Std. Danach löst man den Kolben von der Apparatur, dampft die Lösung auf ein Volumen von etwa 25 ml ein und spült den Extrakt in einen Scheidetrichter von 500 ml Inhalt über. Hier bringt man das Flüssigkeitsvolumen mit Alkohol auf 50 ml und behandelt den Pyrethrinextrakt wie vorstehend beschrieben. Ein Blindversuch mit den verwendeten Reagenzien und, wenn möglich, auch mit einer Probe unbehandelten Papiers derselben Qualität und Herkunft ist unter den gleichen Bedingungen auszuführen. B. Schühlein.

4. Auf Physiologie und Pathologie bezügliche Methoden.

Literatur. Hoppe-Seyler Thierfelder: *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*. Herausgegeben von K. Lang und E. Lehnartz unter Mitarbeit von G. Siebert. Bd. 5: Untersuchung der Organe, Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen. 10. Aufl. VIII. 938 Seiten und 44 Abbildungen. Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg, 1953. Preis gebunden DM 168.—.

Der Band ist in folgende Beiträge aufgeteilt:

Seite 1—181: Blut, bearbeitet von K. Hinsberg. Seite 181—300: Harn, bearbeitet von K. Hinsberg. Seite 300—341: Liquor cerebrospinalis, bearbeitet von K. Hinsberg und W. Geinitz. Seite 341—357: Pathologische Flüssigkeitsansammlungen, bearbeitet von K. Hinsberg und W. Geinitz. Seite 357—362: Speichel, bearbeitet von K. Hinsberg und G. Schmid. Seite 362—372: Sputum, bearbeitet von K. Hinsberg und G. Schmid. Seite 372—383: Magensaft und Mageninhalt: bearbeitet von K. Hinsberg und F. Bruns. Seite 383—389: Darmsaft, bearbeitet von K. Hinsberg und F. Bruns. Seite 389—390: Pankreassaft, bearbeitet von K. Hinsberg und F. Bruns. Seite 390—400: Galle, bearbeitet von K. Hinsberg und F. Bruns. Seite 401—427: Faeces, bearbeitet von K. Hinsberg, H. D. Cremer und G. Schmid. Seite 427—447: Konkremente, bearbeitet von K. Hinsberg und W. Geinitz. Seite 447—666: Untersuchung der Organe, bearbeitet von H. D. Cremer und J. Fuhr. Seite 666—682: Untersuchung der Milch, bearbeitet von W. Diemair. Seite 683—737: Untersuchung von Tumoren, bearbeitet von C. Dittmar. Seite 738—830: Nachweis wichtiger Arzneimittel und Gifte, bearbeitet von K. Gemeinhardt†.

Wie aus dieser Aufzählung hervorgeht, sind die einzelnen Abschnitte durchweg von hervorragenden Sachkennern der verschiedenen Fachgebiete verfaßt worden. Neben allgemeinen Erörterungen der Probleme werden sorgfältig ausgewählte Arbeitsmethoden beschrieben. Ausführliche Literaturangaben ermöglichen eine weitgehende Verwendung der Originalliteratur. Der vorliegende Band wird daher auch über die medizinisch interessierten Kreise hinaus weite Verbreitung finden.

A. Gehring.

Vitamin A. *Die Bestimmung des Vitamin A-Gehaltes in Fischleberölen* nach den Methoden der U. S. Pharmacopoea und der A. O. A. C. gründet sich auf die Absorptionswerte bei den Wellenlängen 310, 325 und 334 $m\mu$. Aus ihnen wird nach der folgenden Gleichung die korrigierte Absorption nach Morton-Stubbs errechnet, die dann nach Multiplikation mit den entsprechenden Faktoren die Vitamin A-Einheiten liefert:

$$\text{Korrig. Abs.} = 7\,A_{325} - 4{,}375\,A_{334} - 2{,}625\,A_{310}.$$

Zur Vereinfachung der Ausrechnung hat L. Korr[1] die Gleichung etwas umgestellt

$$\text{Korrig. Abs.} = 7\,(A_{325} - A_{310}) + 4{,}375\,(A_{310} - A_{334}).$$

[1] Chemist-Analyst 42, 15 (1953). Peder Dewald Oil., Div., Chas. L. Huisking & Co., Inc., Brooklyn, New York.

Da das zweite Glied nur einen kleinen Teil der korr. Absorption darstellt, ist hier die Ausrechnung mit dem Rechenschieber ohne Einbuße an Genauigkeit möglich.
L. Acker.

Über die spektrophotometrischen Bestimmungsmethoden für Vitamin A berichten H. H. Bagnall und F. G. Stock[1] in einer kritischen Übersicht, die im einzelnen nicht referiert werden kann. Es wird darauf hingewiesen, daß Vitamin A und Vitamin A-acetat verschiedene Absorptionskurven zeigen und daß der Umrechnungsfaktor bei 328 mμ für eine 1%ige Lösung bei 1 cm Schichtdicke heute auf 1900 festgesetzt ist. Auch das Lösungsmittel ist für die Extinktionskurve von Einfluß. Die Korrekturmethoden auf den wirklichen Vitamin A-Gehalt werden eingehend behandelt und an Hand von Beispielen erläutert. K. Hinsberg.

Als Vergleichssubstanz für die spektrophotometrische Bestimmung von Vitamin A verwenden M. Vignau und M. Debodard[2] den p-Phenylazobenzoesäureester des Thymols. Er hat gegenüber Chromat und Dichromat den Vorteil, daß er in den gleichen Lösungsmitteln wie Vitamin A gelöst werden kann. Die Substanz ist in kristallinem Zustande und bei Aufbewahrung in braunen Flaschen sehr lange haltbar. Die Absorptionskurve gleicht derjenigen des Vitamin A mit einem Maximum bei 325 mμ.

Bei der Bestimmung von Vitamin A in Lebens- und Futtermitteln umgeht H. Moor[3] die Schwierigkeit einer vollständigen Extraktion des Vitamins aus den wäßrigen Seifenlösungen dadurch, daß er die Seifenlösung auf dem Wasserbad in offener Schale bis zur Trockne eindampft, wobei er den Verlust an Vitamin A durch Zugabe von Hydrochinon unterbindet. Die Untersuchung der Farbentwicklung mit $SbCl_3$ führt zu dem Ergebnis, daß innerhalb 3—8 sec nach dem Zusatz des Reagenses das Extinktionsmaximum konstant ist, während das Abklingen der Farbintensität in den nächsten 30—60 sec verschieden schnell vor sich gehen kann.

10—15 g der zu untersuchenden Substanz werden mit 150 ml Äther im Schütteltrichter geschüttelt. Von der überstehenden, durch Zentrifugieren geklärten Lösung gibt man so viel in eine Kristallisierschale als 100—300 I.E. entspricht. Bei fettarmen Produkten setzt man noch Arachisöl zu, so daß mindestens 1,5 g und höchstens 3,5 g Fett vorliegen. Bei Fettstoffen werden 1—4 g unmittelbar in die Kristallisierschale eingewogen. Dann fügt man 1,5 ml 10%ige alkoholische Hydrochinonlösung und 15 ml alkoholische Natrolauge (10 ml 30%ige Natronlauge werden mit 90 ml abs. Alkohol gemischt) zu. Ein Zusatzversuch mit denselben Mengen an Reagenzien wird mit so viel Vitamin A aus einer Standardlösung (2 Kapseln USP Standard Vitamin A-Acetat mit je 2500 I.E. werden zu 50 ml in hochsiedendem Petroläther gelöst) versetzt, wie in der Probe erwartet werden. Die Kristallisierschale wird 10 min in ein Wasserbad von 70—80° C gestellt. Wenn die Seifenlösung Sirupkonsistenz erreicht hat, fügt man Al_2O_3 (mit 12% Wasser) zu, das man in einem kleinen Meßzylinder bis zur 8 ml-Marke abgemessen hat und verarbeitet die Masse mit dem Spatel. Man beläßt so lange im Wasserbad, bis der Alkohol verdampft ist, jedoch nicht länger als 20 min. Der pulverförmige Rückstand wird in einem Schüttelzentrifugierglas mit Schliffstopfen mit 25 ml Äther versetzt, 1 min tüchtig geschüttelt und zentrifugiert. Der Äther wird durch Schütteln mit 5 ml Wasser in einem weiteren Zentrifugierglas von Seife befreit. Im allgemeinen ist jetzt eine Reinigung durch *Chromatographie* einzuschalten. Dazu wird die Äther-

[1] J. Pharmacy Pharmacol. **4**, 81—94 (1952). City Analysts Lab., Birmingham, (England).

[2] Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **34**, 831—834 (1952). Laborat. A.E.C., Paris.

[3] Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. (Bern) **44**. 257—264 (1953). Hoffmann-La Roche & Co., A.-G., Basel.

lösung eingedampft, mit 10 ml Petroläther (Kp. 90—115° C) aufgenommen und in einer Säule von 10 mm Durchmesser und 190 mm Höhe, die 10 cm hoch mit *Aluminiumoxyd* beschickt ist, unter Anwendung von 30 ml Petroläther chromatographiert. Das Vitamin A wird mit 40 ml Eluiergemisch (15 ml Äther mit Petroläther zu 100 ml aufgefüllt) eluiert. Das Eluat wird im Vakuum eingedampft und mit so viel Chloroform aufgenommen, daß 2 ml die für die Messung optimale Menge von 15—30 I.E. enthalten. Diese 2 ml werden mit 10 ml $SbCl_3$-Lösung (22 g reines $SbCl_3$ werden in 100 ml Chloroform durch Kochen am Rückfluß gelöst: aufbewahren über hochaktivem Al_2O_3, vor Gebrauch durch 3 Papierfilter filtrieren) versetzt, worauf man innerhalb 5 sec die Farbstärke mißt (Lumetron A 400, Filter 610 mμ). Die Auswertung erfolgt an Hand der mit Vitamin A-Acetat aufgestellten Eichkurve. Die Menge an I.E. je 100 g errechnet sich zu $\frac{100 \cdot d \cdot b}{(a-b) \cdot c}$, wo a die gefundenen I.E. im Analysenmaterial mit Zusatz, b dasselbe ohne Zusatz, c die mit dem Zusatz versetzte Probenmenge in g und d die zugesetzte Menge I.E. Vitamin A-Standard bedeuten. Die Genauigkeit des Verfahrens wird mit 3—6% angegeben.

Für die Bestimmung von Vitamin A in Milch- und Milchprodukten verfährt man folgendermaßen[1]: 40 ml Frischmilch oder die gleiche Menge an in Wasser gelösten Milchprodukten werden nacheinander mit folgenden Reagenzien versetzt, wobei nach jedem Zusatz kräftig geschüttelt wird: 10 ml etwa 25%ige Ammoniaklösung, 40 ml reiner abs. Alkohol, 80 ml peroxydfreier Äther, 80 ml Petroläther. Zur Trennung der Schichten läßt man 15 min im Dunkeln stehen, liest dann das Volumen der überstehenden Lösung ab und dampft einen aliquoten Teil in einer Kristallisierschale vorsichtig ein. Den Rückstand versetzt man mit 1,5 ml alkoholischer Hydrochinonlösung und 15 ml alkoholischer Natronlauge, erhitzt dann mindestens 10 min in einem Wasserbad von 70—80° C und verfährt weiter wie oben angegeben.

K. H. Wagner[2] gibt folgende Arbeitsvorschrift für die *Bestimmung von Vitamin A und Carotin in Milch- und Fettprodukten.* 10 g Butter (oder 50—100 ml Milch, 50 g Quark, 10—20 g Käse) werden mit 8 ml einer 50%igen wäßrigen Kalilauge, 30 ml Alkohol und 50 mg Hydrochinon 20 min auf 85—90° C in Stickstoffatmosphäre am Rückflußkühler erhitzt. Anschließend wird das abgekühlte Gemisch mit 50 ml Wasser versetzt und in einen 500 ml-Scheidetrichter übergeführt, wobei das Kölbchen nochmals mit 30—50 ml Wasser nachgespült wird. Dann wird mit 100 ml Äther vorsichtig ausgeschüttelt und die Extraktion 3—4 mal mit je 40 bis 60 ml Äther wiederholt. Die gesammelten Ätherextrakte werden mit Wasser ausgeschüttelt, bis der Extrakt klar ist. Nach Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat wird der Äther im Vakuum bei Stickstoffzufuhr abgedampft und der Rückstand in 5—8 ml Petroläther gelöst. — Die *Chromatographie* erfolgt in zwei Säulen in Stickstoffatmosphäre. Für die Säule I wird Al_2O_3 nach Brockmann verwendet, das durch ein Sieb DIN 70 gesiebt worden ist. Die Fraktion, die durch dieses Sieb fällt, wird mit 2% Wasser in einer luftdichten Flasche geschüttelt und vor Gebrauch über Nacht stehen gelassen (Al_2O_3 I). Für die Säule 2 werden gleiche Teile an Al_2O_3 und einer 10%igen wäßrigen Natronlauge gut durchgemischt. Nach 1stündigem Stehen trocknet man zuerst im Vakuumtrockenschrank bei 30—40° C und schließlich, nach Verdampfen der Hauptmenge des Wassers, bei 100° C 1 Std lang. Dieses Al_2O_3 II wird in kleinen Flaschen unter Paraffinverschluß aufbewahrt. Die Säule I wird in ihrem schmalen Teil (250 × 6,5 mm) mit Al_2O_3 I in Petroläther gefüllt. Die zu chromatographierenden Lösungen werden in einer Menge von 3—6 ml auf

[1] Moor, H.: Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. (Born) 44, 257—264 (1953) und Milchwissensch. 8, 298—300 (1953).

[2] Milchwissensch. 8, 287—291 (1953). Justus-Liebig-Hochschule, Gießen.

die noch feuchte Säule gegeben. Unter Stickstoffzufuhr saugt man langsam durch. Nacheinander werden nun Gemische aus Petroläther mit 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36% Äther durchlaufen gelassen. Bis zu 12% Ätheranteil wird kein Vitamin A eluiert, dagegen ist Carotin in den Eluaten enthalten. Von diesem Gemisch ab wird die Säule 2 mit Al_2O_3 II (110 × 7 mm) angeschlossen, so daß der Durchlauf aus Säule 1 auf Säule 2 tropft. Das Eluat wird in Röhrchen von 1—2 ml Inhalt aufgefangen. Aus den verschiedenen vitamin A-haltigen Fraktionen werden 0,5—1 ml entnommen; man füllt in einem Meßkölbchen mit Petroläther auf 25 ml auf und liest im Spektralphotometer bei 325 mμ ab.

Für die Bestimmung mit dem Carr-Priceschen Reagens wird der aus dem Verseifungsgemisch gewonnene Ätherextrakt im Stickstoffstrom eingedampft und in 3 ml Chloroform gelöst. Davon verwendet man 0,5 ml und fügt 1 ml $SbCl_3$-Reagens (gesättigte Lösung in Chloroform, etwa 21,5%ig). Nach 10 sec kann die Extinktion im Stufenphotometer mit Filter S 61 abgelesen werden. L. Acker.

Vitamin B_1. *Die Bestimmung von Thiamin und Thiaminphosphat in kleinen Blutmengen und Erythrocyten* ist nach den alten Vorschriften entweder wegen mangelnder Empfindlichkeit oder mangelnder Spezifität nicht möglich. Von Helen B. Burch, O. A. Bessey, Ruth H. Love und O. H. Lowry[1] wird deshalb auf die fluorimetrische Methode von O. H. Lowry[2] zurückgegriffen, die durch genaue Untersuchung des Reaktionsablaufes wesentlich empfindlicher gemacht wird. Das Prinzip der Methode ist, die Vitamine mit Trichloressigsäure zu extrahieren, das Thiaminphosphat durch saure Phosphatase zu spalten, später das freie Thiamin mit alkalischer $K_3Fe(CN)_6$-Lösung zu oxydieren und das gebildete Thiochrom in Isoamylalkohol zu lösen. Zwischen gebundenem und ungebundenem Thiochrom kann man unterscheiden, weil Thiochromphosphat in Isoamylalkohol fast unlöslich ist. Die Thiaminstammlösung enthält 50 μg/ml in 0,1 n Salzsäure und wird zum Vergleich 50fach mit 0,1 n Salzsäure verdünnt. Eine Standard-Chininsulfatlösung, die 1,33 bzw. 0,7 mμg/ml in 0,1 n Schwefelsäure enthält, entspricht in der Fluorescenz 5,0 bzw. 2,5 mμg Thiaminhydrochlorid. Die saure Phosphatase, die zur Spaltung von Thiaminphosphat verwendet wird, wird aus dem flüssigen Plasma menschlicher Samenflüssigkeit gewonnen. Man verdünnt 10 ml auf 50 ml mit 0,1 m Kaliumacetatpuffer (p_H 5,0) und löst 16 g Ammoniumsulfat unter Rühren. Nach 10 min wird zentrifugiert, die Lösung entfernt, der Niederschlag verworfen. Zur Lösung gibt man weitere 10 g Ammoniumsulfat, zentrifugiert den Niederschlag ab und verwirft die Lösung. Der Niederschlag wird in 5 ml 0,1 m Kaliumacetatpuffer (p_H 5,0) gelöst und auf Phosphataseaktivität geprüft. Als Einheit wird die Menge bezeichnet, die 3 μg p-Nitrophenol in 5 min bei 25° C aus 0,2 ml 0,4%iger Nitrophenylphosphatlösung bei p_H 5,0 im gleichen Volumen Acetatpuffer abspaltet. Von dem entsprechend mit Wasser verdünnten Präparat sollen 10 μl etwa 600 Einheiten enthalten. Menschliches Sperma enthält 40000—120000 E/ml. Als Fluorimeter wird eine Mikroausführung empfohlen. — *Zur Bestimmung im Blut* entnimmt man 50 μl, versetzt mit 0,23 ml 5%iger Trichloressigsäure, mischt durch Anklopfen, dann Vibration, zentrifugiert nach 30 min höchstens 60 min, entnimmt 0,2 ml der überstehenden Flüssigkeit, bringt auf p_H 4,5—4,8 durch Zusatz von 25 μl 4 m Kaliumacetatlösung und hydrolysiert mit 10 μl der sauren Phosphatase bei 25° C in 4 Std, besser noch über Nacht. Während des ganzen Vorganges ist Staub peinlichst fernzuhalten. Zur Oxydation setzt man 0,1 ml frischbereitetes, alkalisches Oxydationsreagens (10 ml 7,5 n NaOH-Lösung + 0,65 ml 2%ige $K_3Fe[CN]_6$-Lösung)

[1] J. biol. Chemistry **198**, 477—490 (1952). Publ. Health Res. Inst., City of New York, Inc., New York.

[2] J. biol. Chemistry **173**, 677 (1948).

zu und nach 15 sec 0,1 ml eines Reduktionsmittels, welches aus 10 ml 5,5 m NaH_2PO_4-Lösung + 10 μl Perhydrol besteht. Das Thiochrom wird von 0,9 ml Isoamylalkohol aufgenommen, indem man heftig schüttelt und später zentrifugiert. Zur Bestimmung braucht man nur 0,75 ml, die durch U. V.-Licht erregt werden. - Zur *Bestimmung in den roten Blutkörperchen* verwendet man 20 μl, die mit 0,11 ml physiologischer NaCl-Lösung gemischt, mit 0,11 ml 10%iger Trichloressigsäure gefällt und endlich enteiweißt werden. Die weitere Verarbeitung geschieht wie oben. *Weiße Blutzellen* werden nach den Angaben von O. A. Bessey u. Mitarb. gewonnen[1], die in der gleichen Weise enteiweißt und behandelt werden. — Zur *Bestimmung von Thiamin und Thiaminphosphat im Serum* muß man 0,1 ml Serum mit 0,55 ml 5%iger Trichloressigsäure enteiweißen und vom Zentrifugat 0,2 ml, wie bei Vollblut, verarbeiten. Zur Bestimmung des freien Thiamins geht man von 0,2 ml Serum aus, verzichtet aber auf die fermentative Spaltung. Da Thiochrom durch UV-Licht zerstört wird und sich die Bestrahlungskurven von Thiamin, Blutfiltraten und theoretischen Werten vollkommen decken, wird angenommen, daß der Methode eine ziemliche Spezifität zukommt. Tiere, die mit Thiamin gesättigt sind, zeigen innerhalb von 36 Tagen bei thiaminfreier Kost einen Abfall der Thiaminwerte im Blut auf fast 0. Bei Zusatzversuchen beträgt die Ausbeute zwischen 97 und 108%. Beim gesunden Menschen wird im Gesamtblut 4,3—5,2 μg%, in den roten Blutkörperchen 6,6—9,4 μg% und in den weißen Blutzellen 55,8—77,4 μg% gefunden. Frisches Blut und auch Oxalatblut halten sich im Eisschrank 48 Std lang unverändert. Bei —28° C ist sogar nach 1 Woche keine Änderung eingetreten. Werden Menschen mit 1 mg Thiaminhydrochlorid belastet, so steigt der Thiamingehalt des Blutes nach 1 Std bereits an, zu gleicher Zeit ist auch eine hohe Ausscheidung im Harn zu beobachten. K. Hinsberg.

J. Courteix[2] schätzt rein rechnerisch die Fehler ab, die bei *Bestimmung von Vitamin B_1 nach der Thiochrommethode* bei der Herstellung der Lösungen der zu untersuchenden Substanz und der Vergleichsversuche auftreten, wobei er auf insgesamt 1—1,5% kommt. Diese Rechnung ist jedoch ohne praktischen Wert, da die Fehler bei der Oxydation, der Extraktion und den Ablesungen am Fluorimeter viel erheblicher ins Gewicht fallen. L. Acker.

M. Fujiwara und K. Matsui[3] schlagen zur *Bestimmung von Thiamin als Thiochrom* Bromcyan an Stelle von Kaliumcyanoferrat(III) als Oxydationsmittel vor. Nach ihren Untersuchungen besitzt Bromcyan vor dem Cyanoferrat(III) folgende Vorteile: Es gibt in weiten Grenzen unabhängig von der Höhe des Überschusses richtige Ergebnisse; der p_H-Wert darf von 1—7 schwanken; die Temperatur spielt zwischen 3 und 50° C keine Rolle; Salze stören nicht, ebensowenig andere Reduktionsmittel wie z. B. Cystein. Heteropyrithiamin bildet unter den Reaktionsbedingungen kein Thiochrom, wohl aber Thiothiamin, doch kann dessen Einfluß durch Temperaturerniedrigung stark eingeschränkt werden. - *Ausführung.* Die Einwaage an feingepulverter Substanz mit 3—6 μg Thiamin erwärmt man mit 40 ml Wasser nach Einstellen auf p_H 4 unter Rühren 15 min im Wasserbad auf 80° C, fügt 3 ml 2%ige Takadiastaselösung und einige Tropfen Toluol hinzu und läßt über Nacht im Brutschrank bei 38° C stehen. Danach verdünnt man auf 50 ml und zentrifugiert. Von der überstehenden Lösung entnimmt man einen 1—2 μg Thiamin enthaltenden Teil, bringt ihn auf p_H 4,5 und läßt ihn mit einer Geschwindigkeit von 1 ml je

[1] Siehe György, P.: Vitamin methods **1**, S. 287, New York 1950. — Bessey, O. A., O. H. Lowry und M. J. Brock: J. biol. Chemistry **168**, 197 (1947).

[2] Ann. pharmac. franç. **11**, 279—283 (1953).

[3] Analyt. Chemistry **25**, 810—812 (1953). Univ. Kyoto (Japan).

Minute durch eine mit 1,5 g synthetischem Zeolith gefüllte Austauschersäule von 7 mm lichter Weite laufen. Man wäscht mit heißem Wasser nach und eluiert das adsorbierte Thiamin mit 25 ml einer siedenden Lösung von 25% Kaliumchlorid in 0,1 n Salzsäure. 5 ml Eluat versetzt man mit 3 ml Bromcyanlösung (in eiskaltes, gesättigtes Bromwasser ebenfalls eiskalte 10%ige wäßrige Kaliumcyanidlösung bis zur Entfärbung zutropfen lassen; Haltbarkeit bei 22° C 3 Std), mischt gut durch, fügt 2 ml 30%ige Natronlauge hinzu und mischt wieder. Das entstandene Thiochrom extrahiert man mit 20 ml Isobutylalkohol wie üblich und mißt die Fluorescenz. Daneben macht man eine Blindbestimmung mit einem anderen Teil Eluat und den Reagenzien, aber ohne Bromcyanlösung. F. Neumann.

Vitamin B_2. *Eine neue mikrobiologische Methode zur schnellen Bestimmung von Riboflavin in Milch* von V. Sreenivasamurthy, H. Laxminarayana und K. K. Iya[1] beruht auf der Beobachtung, daß die mikrobiologische Reduktion von 2.3.5-Triphenyltetrazoliumbromid zu Triphenylformazan abhängig ist von der Riboflavinkonzentration des Nährbodens. Streptococcus faecalis 190 dient als Testorganismus. Die Mikroorganismen werden zuerst 18 Std bei 37° C in einem Nährboden nach Snell und Strong[2], der nur 0,0005 mg Vitamin B_2 pro ml enthält, wachsen gelassen. Dann werden die Zellen zentrifugiert, gewaschen und wieder suspendiert in Phosphatpuffer vom p_H 6,8. Dabei wird auf eine Trübung von 150 Klett-Summerson-Einheiten (Blaufilter Nr. 42) eingestellt, entsprechend etwa 150 Millionen Zellen je ml. 0,5 ml der Zellensuspension werden in Reagensgläser gegeben, von denen jedes 20 mg Glucose, 1 mg Thioglykolsäure und 1 mg Tetrazoliumbromid enthält. Dazu fügt man 0,1, 0,2, 0,3 und 0,4 ml eines im Verhältnis 1:100 verdünnten Milchserums, das durch Fällung mit 0,1 n Salzsäure gewonnen worden war, und füllt mit dest. sterilem Wasser auf 2 ml auf. Nach 3 Std wird das gebildete Formazan mit 5 ml n-Butanol ausgezogen und seine Farbintensität im Klett-Summersonschen photoelektrischen Colorimeter gemessen. Den Betrag an Riboflavin entnimmt man einer Eichkurve, die man nach den Ergebnissen von parallellaufenden Versuchen mit Zusätzen von 0,002—0,02 mg Riboflavin aufgestellt hat. L. Acker.

Vitamin B_{12}. G. E. Boxer und J. C. Rickards[3] teilen in Ergänzung ihrer früheren Untersuchungen[4] mit, daß bei der *Bestimmung von Vitamin B_{12} in Leberkonzentraten* mit dem beim Belichten freigesetzten HCN eine Substanz auftritt, die in Natronlauge absorbiert wird und die folgende CN -Bestimmung stört. Die Störungen werden beseitigt, wenn man statt Natronlauge eine Absorptionsflüssigkeit verwendet, die 0,02 m Ag_2SO_4 in 0,1 n Schwefelsäure enthält. Hier wird nur HCN und zwar quantitativ zurückgehalten, während die störende Substanz durchläuft. Nach Beendigung der Belichtungsreaktion wird die H_2SO_4-Konzentration in dem Absorptionsgefäß auf 7 n erhöht. HCN läßt sich dann im Stickstoffstrom in die Vorlage mit 0,1 n NaOH-Lösung übertreiben und nach der früher beschriebenen colorimetrischen Methode[5] (zweckmäßig in N_2-Atmosphäre) bestimmen.

A. Kurtenacker.

---

[1] Milchwissensch. 8, 286—287 (1953). Indian Dairy Res. Inst., Bangalore.

[2] Ind. Engng. Chem., Anal. Ed. **11**, 246 (1939).

[3] Arch. Biochem. Biophysics **39**, 281—286 (1952). Merck & Co., Inc., Rahway, N. J.

[4] Vgl. diese Z. **137**, 314 (1952/53). (Druckfehlerberichtigung: In dem Referat soll hinter dem Autornamen Rickards [11. Zeile von unten] der Literaturhinweis [1] und nicht [2] stehen.)

[5] Vgl. diese Z. **137**, 279 (1952/53).

Die Vitamin B_{12}-Aktivität im menschlichen Serum wird von H. L. Rosenthal und H. P. Sarett[1] mit Lactobacillus leichmannii (LL) bestimmt. Insbesondere wird noch untersucht, ob Vitamin B_{12} im Serum in gebundener Form vorkommt, die sich mit dem Mikroorganismus nicht direkt bestimmen läßt. Die Kultur von LL (ATCC 4797) wird mit den Blutpräparaten 65—72 Std bei 37° C bebrütet und mit 0,1 n Alkali titriert. Bei −20° C kann Serum ohne Veränderung bis zu 6 Monaten aufgehoben werden. *Arbeitsweise.* 5 ml Serum werden mit 5 ml 1%igem Acetatpuffer (p_H 4,6) und 20 ml dest. Wasser gemischt und 30 min im Wasserbad gekocht. 9 ml des klaren Zentrifugats werden auf genau p_H 6,9 eingestellt und auf 15 ml aufgefüllt (Verdünnung 1:10). Man entnimmt hiervon Proben von 2—5 ml zur Bestimmung des Vitamin B_{12}-Gehaltes, den Rest zur Untersuchung der alkalilabilen Form. Zugesetztes Vitamin B_{12} wird zu 100% wiedergefunden. Aus eingehenden Untersuchungen geht hervor, daß beim Erhitzen bis p_H 7,5 kein Vitamin zerstört wird, daß aber bei p_H 10,5 die ganze Aktivität sich verliert. Auch die Temperatur von 100° C und die Zeit von 30 min sind optimal. In 20 Seren wird ein B_{12}-Gehalt von 0,08 und 0,42 (0,2 mμg/ml) gefunden. Wird die enteiweißte Serumprobe bei p_H 11,0 ½ Std erhitzt, so wird der größte Teil der B_{12}-Aktivität zerstört. Es bleiben noch 3,4% der ursprünglichen Aktivität übrig, die nicht auf B_{12} bezogen werden können. Das im Serum befindliche B_{12} ist nicht dialysierbar. Bei Zusatz von 10 und 30 mμg B_{12} und Dialyse gegen Pufferlösung wird das zugesetzte Vitamin fast vollständig gebunden. Der p_H-Wert ist zwischen 5,0—8,0 ohne Einfluß. Diese Versuche zeigen, daß Vitamin B_{12} im Serum an eine unbekannte Fraktion gebunden ist, so daß es nicht mehr dialysierbar ist, obschon Yamamoto und Mitarb.[2] beschrieben haben, daß dies für Hundeserum nicht zutreffen soll. Die Spezifität von LL ist nicht so groß wie die von Euglena gracilis. Da aber durch Erhitzen bei alkalischer Reaktion Vitamin B_{12} zerstört wird, ist anzunehmen, daß die gefundenen Werte zum größten Teil auf Vitamin B_{12} zu beziehen sind. Desoxyriboside sind unter den Versuchsbedingungen stabil. Es wird aber angenommen, daß dies für den biologischen Wachstumstest nicht in Frage kommt.

Nach J. M. Cooperman, R. Drucker und Tabenkin[3] kann bei der *mikrobiologischen Bestimmung von Vitamin B_{12}* Lactobacillus leichmannii (LL) durch den schneller wachsenden Lactobacillus lactis Dorner ATCC 8000 (LLD) ersetzt werden. Durch Zugabe von Cyanid zum Nährmedium ergeben sich Werte, die mit den mit LL erhaltenen vergleichbar sind. K. Hinsberg.

Die spektrophotometrische Bestimmung des Vitamin B_{12}-Gehaltes, die G. O. Rudkin jr. und R. J. Taylor[4] vorschlagen, beruht auf den Unterschieden in den Absorptionsspektren von Vitamin B_{12} und seinem Dicyanidkomplex, der in Anwesenheit von überschüssigem Cyanid-Ion entsteht. Der Absorptionsunterschied besitzt bei 582 mμ ein Maximum entsprechend $E^{1\%}_{1\,cm} = 54$. Bei der Untersuchung von Gärbrühen und dergleichen werden störende gefärbte Verunreinigungen durch selektive Extraktion von Vitamin B_{12} und seinem Dicyanidkomplex mit Benzylalkohol entfernt. Aus der organischen Phase können B_{12} und das Dicyanid mit Hilfe von Chloroform in die wäßrige Phase rücküberführt werden. Der Dicyanidkomplex

[1] J. biol. Chemistry **199**, 433—442 (1952). Tulane Univ.-School Med., New Orleans, Louis. (USA).

[2] Yamamoto, R., C. Barrows jr., C. Lang und B. F. Chow: J. Nutrit. **45**, 507 (1951).

[3] J. biol. Chemistry **191**, 135—141 (1951). Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, N. J. (USA).

[4] Analyt. Chemistry **24**, 1155—1156 (1952). Chas. Pfizer Co., Inc., Brooklyn, N. Y.

ist bei p_H 9,5—11,5 beständig. Man mißt also einmal bei diesem p_H-Wert in Gegenwart eines Alkalicyanidüberschusses, das andere Mal bei p_H 5—6, wobei Vitamin B_{12} aus dem Dicyanidkomplex rückgebildet wird. Die Bestimmungen sind auf etwa 5% genau. — *Ausführung.* Man versetzt die zu untersuchende Lösung, die etwa 200 μg Vitamin B_{12} enthält (nicht weniger als 1 μg/ml), mit festem Natriumcyanid bis zur Endkonzentration von 1% Cyanid, bringt, wenn nötig, mit 10%iger Natronlauge auf p_H 9,5—10 und läßt 5 Std bei Raumtemperatur zur Vollendung der Reaktion stehen. Dann löst man 20% festes Na_2SO_4 in der Lösung, stellt auf p_H 11,0 bis 11,5 ein und schüttelt 3mal mit je $^1/_{10}$ des Volumens Benzylalkohol aus. Die vereinigten Extrakte werden nach Zugabe des halben Volumens Chloroform 3mal mit je $^1/_{10}$ Volumen Wasser ausgeschüttelt. Man füllt die wäßrige Phase auf 25 ml auf, versetzt einen 10 ml-Anteil mit 2 ml 10%iger NaCN-Lösung, einen zweiten 10 ml-Anteil mit 2 ml 12,5%iger KH_2PO_4-Lösung (um auf p_H 5—6 zu kommen) und photometriert beide bei 582 mμ in einer 2 cm-Küvette. Unter Berücksichtigung des obigen ΔE-Wertes für reines Vitamin B_{12} und einer Korrektur von 3% für Extraktionsverluste wird der Vitamin B_{12}-Gehalt berechnet. H. Zellner.

Vitamin C. *Bei der Gesamtbestimmung von Vitamin C* ersetzt G. Wendland[1] den Schwefelwasserstoff zur Reduktion der Dehydroascorbinsäure durch das einfacher zu handhabende Thioacetamid und kommt damit innerhalb der Fehlergrenzen der Methode zu den gleichen Ergebnissen. — *Arbeitsvorschrift.* Das Material wird (nach Verreiben mit Sand oder NaCl unter Zusatz von Metaphosphorsäure oder Salzsäure)mit 2%iger Metaphosphorsäure auf ein bestimmtes Volumen gebracht und zentrifugiert oder filtriert. Ein aliquoter Teil wird mit je 5 ml Quecksilberacetatlösung (125 g im Liter) und Blei-Natriumacetatlösung (125 g Bleiacetat und 500 g Natriumacetat im Liter) versetzt, umgeschüttelt und 20—25 ml 2%ige Thioacetamidlösung zugefügt. Nach dem Absetzen des Niederschlags (am besten über Nacht) wird filtriert, das Filtrat mit 20—30 ml 4%iger Metaphosphorsäurelösung versetzt und Kohlensäure bis zur negativen Reaktion gegen Bleiacetatpapier eingeleitet. Entsprechende Mengen der Flüssigkeit werden in bekannter Weise mit 0,001 n Dichlorphenolindophenollösung titriert. L. Acker.

Die colorimetrische Bestimmung der Ascorbinsäure mit Dichlorphenolindophenol kann nach A. Zeller[2] durch Zugabe von Formaldehyd in entsprechend gepufferten Lösungen zu einem spezifischen Verfahren ausgestaltet werden. Von allen bisher bekannten Stoffen reagiert nämlich nur die Ascorbinsäure zwar bei p_H 3,5, nicht aber bei p_H 1,5 mit Formaldehyd unter Verlust der Reduktionsfähigkeit. Die Unterschiede in der Färbung zugesetzter Dichlorphenolindophenollösung bei beiden p_H-Werten ergeben also ein spezifisches Maß für den Ascorbinsäuregehalt. — *Ausführung.* Man extrahiert das zu untersuchende Material mit heißer 2%iger Metaphosphorsäurelösung unter Verreiben mit Quarzsand. Nach dem Zentrifugieren und Waschen des Rückstandes wird auf ein bestimmtes Volumen so aufgefüllt, daß 10 ml Lösung 10—70 μg Ascorbinsäure enthalten. Flüssigkeiten, z. B. Obstsäfte, werden unmittelbar auf einen Gehalt von 2% Metaphosphorsäure gebracht. In 2 Reagensgläser trägt man gleiche Mengen der zu untersuchenden Probe ein, verdünnt mit 2%iger Metaphosphorsäurelösung auf 10 ml und bringt die Lösung in dem einen Rohr mit 1,5 ml 0,5 m Salzsäure auf p_H 1,5, in dem anderen Rohr mit 1,5 ml 0,5 m Natriumcitratlösung auf p_H 3,5. Beide Röhrchen werden dann mit je 3 ml 1 m Formaldehydlösung versetzt, 10 min in ein Wasserbad von 35° C gestellt und anschließend genau 5 min in einer Eis-Wassermischung von 0° C gekühlt. Die

[1] Arch. Pharmaz. **286**, 158—164 (1953). Krankenhausapoth. Heidberg, Hamburg.
[2] Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. (Wien) **5**, 1—10 (1952).

Lösung von p_H 1.5 wird hierauf mit 8 ml[1] Wasser, darüber mit 2,7 ml[1] 0,5 m Citratlösung und 1 ml 0,001 n Dichlorphenolindophenollösung überschichtet, durchgemischt und sofort photometriert. Die Lösung von p_H 3,5 wird mit 5,5 ml Pufferlösung von p_H 3.5 (100 ml 2%ige Metaphosphorsäurelösung + 15 ml 0,5 m Na-Citratlösung + 30 ml Wasser) und 1 ml 0,001 n Farbstofflösung versetzt und ebenfalls sofort im Stufenphotometer gegen Blindansatz gemessen. Die Eichkurven werden mit reinem Ascorbinsäurelösungen angefertigt. Die Farbstofflösungen sind täglich nachzuprüfen.

Cystin in 10fachem Überschuß, Thioharnstoff in 100fachem Überschuß, Na_2S in 8facher Menge, Glutathion in 40fachem, karamelisierte Glucose in 5fachem Überschuß stören nicht. H_2S wird vor der Bestimmung durch Luft ausgetrieben.

O. Reichard.

Bei der Bestimmung der gebundenen Ascorbinsäure im Lebergewebe wurden widersprechend Ergebnisse erzielt. Wie W. N. Sumerwell und R. R. Sealock[2] mitteilen, wird die gebundene Ascorbinsäure bereits durch verdünnte Säure abgespalten und entzieht sich so der Bestimmung. Wenn man aber 10 g homogenisierte, frische Schweineleber 5mal in der Kälte mit je 30 ml eiskaltem Äthanol extrahiert, so wird nur die freie Ascorbinsäure extrahiert, die man mit 10 ml 5%iger Metaphosphorsäure stabilisiert. Wird der Geweberückstand anschließend mit 20 ml 5%iger Metaphosphorsäure 15 min im kochenden Wasserbad hydrolysiert, so geht die in Freiheit gesetzte Ascorbinsäure in Lösung. Nach dem Abkühlen wird das Hydrolysat 5 min zentrifugiert, dekantiert, der Niederschlag mit 10 ml der Metaphosphorsäure extrahiert. Die Extraktion muß unter Kohlensäure erfolgen, um eine Oxydation zu verhindern. Der Mittelwert der freien Ascorbinsäure betrug 80 μg/g Leber, die gebundene 18 μg/g Leber. Die Ascorbinsäure konnte als 2,4-Dinitrophenylhydrazon identifiziert werden mit einem Schmelzpunkt von 280—281° C. Dem Metaphosphorsäureextrakt wird gesättigtes Bromwasser zugesetzt, bis eine gelbe Farbe bestehen bleibt, dann der Überschuß an Brom durch 10%ige Thioharnstofflösung in 50%igem Äthanol im geringen Überschuß entfernt und schließlich das Hydrazon wie üblich bestimmt. Auf diese Weise lassen sich in der Leber immer 15—20% der Gesamtmenge als gebundene Ascorbinsäure nachweisen.

Über Ascorbinsäureverluste infolge katalytischer Beschleunigung der Luftoxydation durch Metall-, insbesondere Kupferspuren stellte M. P. Lamden[3] Versuche an. Die Kupferspuren können in das Untersuchungsmaterial (Gewebe) z. B. beim Verreiben in dem aus Metall gefertigten „Waring-Blendor" gelangen. Die Versuche ergaben, daß bis zu 50% Ascorbinsäureverlust durch das Kupfer eintreten können. Ausschluß von Luft beim Verreiben, Zusatz von Metaphosphorsäure und Zinn(II)-chlorid oder Thioharnstoff vermindern die Verluste merklich.

K. Hinsberg.

Vitamin D. *Für die chemische Bestimmung von Vitamin D in Lebensmitteln und pharmazeutischen Produkten* sind bisher eine Reihe von Verfahren vorgeschlagen worden, die W. Wodsak[4] einer kritischen Überprüfung unterzogen hat. Er kommt zu dem Ergebnis, daß eine von J. Green[5] empfohlene Methode noch am besten an das biologische Verfahren herankommt. Nach dieser Methode werden 7-Dehydro-

[1] Diese in der Originalarbeit angegebenen Zahlen sind vermutlich unrichtig. Das Gesamtvolumen der zugesetzten Flüssigkeit sollte ja 5,5 ml sein (vgl. 2 Zeilen tiefer). (D. Ref.)

[2] J. biol. Chemistry **196**, 753—759 (1952). State Coll., Ames, Iowa (USA).

[3] Analyt. Chemistry **22**, 1139—1141 (1950). Univ. Vermont, Burlington, Ut. (USA).

[4] Fette und Seifen **55**, 118—122 (1953). Hygien. Inst. d. Stadt Hamburg.

[5] Biochemic. J. **49**, 36, 45 (1951).

cholesterin und Ergosterin auf Grund ihrer geringen Löslichkeit in 72%igem Alkohol abgetrennt. Die weitere Reinigung von Sterinen erfolgt durch eine Digitoninfällung. Die Entfernung des dann noch verbleibenden Tachysterins und auch des Vitamins A gelingt durch Adsorption an besonders behandelter Floridinerde. Die eluierten D-Vitamine werden mit $SbCl_5$-Lösung zur Reaktion gebracht, die entstandene Färbung wird gemessen. $SbCl_5$, das in $SbCl_3$ in geringen Mengen vorliegt, soll nach J. Tiews[1] ausschließlich für die bekannte Reaktion mit den D-Vitaminen verantwortlich sein. Das Reagens wird dabei auf folgende Weise hergestellt: In 50 ml rauchende Salzsäure (d = 1,19) wird nach und nach trockenes $SbCl_3$ eingetragen, bis eine Dichte von 1,35–1,36 erreicht ist, wozu etwa 13 g $SbCl_3$ benötigt werden. Dann setzt man 2 g Kaliumdichromat zu, worauf die rotbraune Farbe in grün umschlägt. Hierbei können maximal etwa 6 g $SbCl_5$ entstehen. Zur Vitamin D-Bestimmung wurde z. B. in Hefe folgendermaßen verfahren:

2 g Hefe (fein gemahlen) werden 20 min mit 20 ml 96%igem Alkohol am Rückfluß gekocht, abzentrifugiert und nochmals mit 10 ml Alkohol extrahiert. Nach Eindampfen zur Trockne wird der Rückstand mit genau 20 ml des gleichen Alkohols aufgenommen, in ein Zentrifugenglas übergespült und mit 6,6 ml Wasser versetzt. Nach 5 min wird der Niederschlag abzentrifugiert und mit einigen ml 72%igem Alkohol nachgewaschen. Man fügt dann eine Lösung von 100 mg Digitonin in 5 ml 72%igem Alkohol zu, trennt nach 1 Std durch Zentrifugieren ab, dampft die Lösung ein, löst den Rückstand nach sorgfältigem Trocknen über P_2O_5 in 20–30 ml Petroläther, engt auf 5–10 ml ein und chromatographiert. Dazu wird ein 12–13 mm weites und 150 mm langes Rohr mit salzsäurebehandelter Floridinerde zu 7–8 cm Höhe angefüllt und einmal mit 20 ml 96%igem Alkohol und 5mal mit je 6 ml niedrigsiedendem Petroläther gewaschen. Darauf wird die Testlösung auf die Säule gegeben, nach Eindringen mit 25 ml Petroläther nachgewaschen und dann mit 100 ml CCl_4 eluiert. Chromatographieren und Eluieren sollen in 1 Std beendet sein. Das Eluat wird eingedampft, der Rückstand wird mit Chloroform aufgenommen und zu 10 ml aufgefüllt. Die Messung erfolgt nach J. Tiews[1].

Über Erfahrungen zur Bestimmung des Vitamin D_3-Gehaltes in homogenisierter vitaminierter Vollmilch berichten E. Vogel und H. Neukam[2]. Da bei der homogenisierten Milch eine Abtrennung des Fettes durch Zentrifugieren nicht möglich ist, wird die ganze Milch bei 40° C in Stickstoffatmosphäre mit methylalkoholischer Kalilauge verseift. Für die Behandlung mit Petroläther zur Gewinnung des Unverseifbaren wird der „Starmix" benützt; bei geringen Umdrehungszahlen wird Schaumbildung vermieden. Anschließend wird im Scheidetrichter mit Hilfe von lauwarmem Wasser und kleinen Mengen an Methylalkohol die Petrolätherschicht abgetrennt und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand, der noch geringe Mengen an Seifen enthält, wird mit Aceton mehrfach aufgenommen. Das klare Filtrat enthält das Unverseifbare und das Vitamin D. Die Abtrennung der Carotinoide nehmen die Verff. *papierchromatographisch* vor und verwenden dabei Papier von Schleicher und Schüll Nr. 2043b, das sie vorher mit 2%iger ätherischer Vaselinlösung behandelt haben. Entwickelt man mit 20–50%igem wäßrigem Aceton, so wandern die Carotinoide allein; das Vitamin D kann erst bei einer Konzentration von 65–70% abgetrennt werden. Man arbeitet daher zuerst mit 65–70%igem Aceton im aufsteigenden Chromatogramm, das zweidimensionale Chromatogramm wird dann mit 40%igem Aceton entwickelt. Das Vitamin D läßt sich als brauner Fleck sichtbar

[1] Diss. Kiel 1952. Vgl. auch J. Brüggemann, W. Krauss und J. Tiews, diese Z. **135**, 241 (1952).

[2] Milchwissensch. 8, 284–258 (1953). Bayerische Milchversorgung GmbH., Nürnberg.

machen durch Eintauchen des Papiers in eine gesättigte petrolätherische Jodlösung und Verdunsten des überschüssigen Jods und Lösungsmittels. Durch Mitlaufenlassen von bekannten Vitamin D-Mengen ist eine quantitative Auswertung möglich.
L. Acker.

Vitamin E. *Die Bestimmung im Blutplasma* wird nach P. N. Joshi und R. G. Desai[1] auf Grund der Reaktion von Emmerie und Engel folgendermaßen durchgeführt: Man gibt 5 ml Alkohol tropfenweise zu 5 ml Plasma aus Citratblut und versetzt weiter mit 5 ml Chloroform unter Schütteln, so daß eine feine Emulsion entsteht. Man läßt 2 Std im Eisschrank stehen, zentrifugiert dann 10 min, wobei sich das Chloroform unten, der wäßrige Alkohol oben abscheidet und dazwischen der Niederschlag schwimmt. Von dem Chloroformextrakt entnimmt man einen aliquoten Teil verdunnt mit Chloroform auf 1,6 ml, setzt 0,2 ml 0,12%ige α-α′-Dipyridyllösung in Alkohol zu, wobei meist eine Klärung der vorhandenen Trübung eintritt und mißt die Absorption bei 460 mμ. Diese ist meist bei normalem Plasma zu vernachlässigen, wenn entweder wenig Carotin vorhanden ist, oder sehr wenig carotinähnliches Material aus dem Plasma vom Chloroform aufgenommen wird. Nur bei carotinreichen Plasmen ergibt sich eine gelbe Farbe. Eine Korrektur ist dann notwendig. Man setzt zu dem Chloroform weiter 0,2 ml alkoholischer 0,12%iger Eisen(III)-chloridlösung, schuttelt und mißt nach 2 min die Extinktion der entstandenen roten Farbe bei 520 mμ. Die Farbe ist gewöhnlich 90 min im Dunkeln stabil. Die Eichkurve wird mit reinem Tocopherol oder mit β-Carotin aufgestellt. Eine Reihe von Faktoren, welche die Farbbildung beeinflussen, wird untersucht und ein Verfahren vorgeschlagen, durch welches physiologische und unphysiologische Hemmstoffe unterschieden werden können. K. Hinsberg.

R. Beckmann[2] bedient sich zur *Bestimmung von Tocopherol im Serum* der Methode von Emmerie und Engel unter Einschaltung einer Verseifung und einer *chromatographischen Adsorption* zur Reinigung des extrahierten Vitamins. Er geht dabei folgendermaßen vor: 2—5 ml Serum werden in einem 100 ml-Rundkolben mit 10 ml abs. Alkohol und 6 ml 2,6 n methanolischer Kalilauge versetzt und 10 min auf 70—75° C unter Einleiten von Stickstoff am Rückflußkühler erhitzt. Nach der Verseifung setzt man 10 ml Wasser und 20 ml peroxydfreien Äther zu und schüttelt im Scheidetrichter aus. Die wäßrige Phase wird nochmals mit der gleichen Menge und ein drittes Mal mit 10 ml Äther behandelt. Die vereinigten Ätherextrakte wäscht man nacheinander mit je 10 ml 2 n waßriger Kalilauge, n Schwefelsäure und 2—3mal mit Wasser. Nach Trocknen mit wasserfreiem Natriumsulfat dampft man in Stickstoffatmosphäre bei 40—45° C ein. Zur Reinigung löst man den Rückstand in 5 ml Benzol und filtriert durch eine 20 mm hohe und 12 mm weite Säule von gereinigter Floridin XXF-Erde. [200 g dieser Erde und 25 g Zinn(II)-chlorid werden mit 500 ml konzentrierter Salzsäure zum Sieden erhitzt und durch Absaugen über einer Glasfritte wieder von der Säure befreit. Nach dem Nachwaschen mit 600 ml abs. Alkohol und mit 1,5—2 l Benzol wird die Erde in noch feuchtem Zustande in eine Glasstöpselflasche übergefuhrt und unter Benzol aufbewahrt.] Man wäscht 4mal mit 5 ml Benzol nach und dampft die gesammelten Filtrate bei 45° C im Vakuum unter Stickstoffschutz ein. Den öligen Rückstand nimmt man mit 10 ml reinem Alkohol auf. Davon werden ein oder mehrere ml je nach der vorhandenen Menge mit Alkohol zu 11 ml aufgefüllt, nachdem man 0,5 ml 0,2%ige alkoholische $FeCl_3$-Lösung und danach 0,5 ml 0,5%ige alkoholische α, α′-Dipyridyllösung zugesetzt hatte. Die Ablesung erfolgt am Photometer „Eppendorf" (Hg-Filter 546) nach 5 min gegen eine

[1] Indian J. med. Res. **40**, 277—287 (1952). Tata Memorial Hosp., Parel, Bombay.
[2] Int. Z. Vitaminforsch. **24**, 393—403 (1952). Univ.-Kinderklinik, Münster/Wf.

Vergleichslösung aus 11 ml Alkohol, enthaltend je 0,5 ml der genannten Reagenzien. Im Stufenphotometer ist Filter S 50 zu nehmen und wegen der Empfindlichkeit der Lösung gegen weißes Licht sehr rasch (1,5 min) zu arbeiten. Der Tocopherolgehalt wird aus einer Eichkurve abgelesen, die unter Verwendung von Verdünnungen von 1—300 μg d, l-α-Tocopherol ml aufgestellt worden ist. Der durchschnittliche Fehler wird mit $\pm$ 7% angegeben. L. Acker.

Die Bestimmung einer Reihe von Metallen in biologischem Material wird von K. Kimura, R. Hara und N. Iijima[1] im Rahmen einer zusammenfassenden Übersicht über den Stoffwechsel anorganischer Elemente bei hämorrhagischem Schock besprochen. Die Zusammenfassung kann im einzelnen nicht referiert werden. Es wird empfohlen, das Eisen im Serum mit α-α'-Dipyridyl, in Organen mit Thiocyanat zu bestimmen. Cu und Zn können mit der Dithizonmethode, Co in Organen mit der Nitroso-R-salzreaktion untersucht werden. Für Ni schlagen die Verfasser die Bestimmung mit Dimethylglyoxim, für Mn die Bestimmung als Permanganat nach Oxydation mit Silberperoxyd vor. Für Mg eignet sich die Bestimmung mit Titangelb. K. Hinsberg.

Die Verwendung von Pilzkulturen zur Bestimmung von Metallspuren in biologischem Material ist von D. J. D. Nicholas[2] ausgearbeitet worden. Er benutzt Aspergillus niger oder Penicillium glaucum. Beide Pilze bedürfen zum Wachstum Eisen, Kupfer, Zink, Mangan und Molybdän, während Gallium, Vanadium oder Kobalt nicht notwendig sind. Bei der Prüfung von Testlösungen mit bekanntem Metallgehalt zeigt sich, daß das Trockengewicht der Pilzkulturen in Abhängigkeit von der Metallmenge steht und daß diese daher gravimetrisch ermittelt werden kann. Außerdem erfolgt aber auch visuelle Prüfung des Wachstums. Das Verfahren ist den chemischen Methoden in bezug auf Empfindlichkeit überlegen. In 50 ml Kulturlösung können noch 0,05 μg Cu, 0,25 μg Zn, 0,01 μg Fe, 0,01 μg Mn oder 0,0001 μg Mo nachgewiesen werden. Bei der Prüfung von Erde zeigte sich, daß dort überall ein vermindertes Wachstum der Pilzkulturen stattfand, wo auch die Saatpflanzen Mangel an diesen Spurenmetallen aufwiesen. In einzelnen Fällen, z. B. bei eisenarmen Böden, konnte aber kein Unterschied gefunden werden. Durch Veränderung des p_H-Wertes der Kulturlösung können die einzelnen Metalle getrennt bestimmt werden. Der Eisengehalt normaler und chlorotischer Blätter zeigte keinen Unterschied. Durch Spurenmetallmangel tritt bei Aspergillus niger eine Änderung der Stoffwechselvorgänge ein, so daß die Bildung von Vitamin B_2 und B_{12} sowie die Aktivität von Fermenten beeinflußt wird. Das normale, aus verzinntem Kupfer destillierte Wasser enthält noch beträchtliche Metallspuren. Nach 2maliger Destillation aus Hartglas ändern sich die noch eben nachweisbaren Metallspuren nicht mehr. Die Kulturlösung enthält als Nährlösung Dextrose, KNO_3, KH_2PO_4, $MgSO_4$ und $Ca(NO_3)_2$, als Zusätze sehr geringe Mengen verschiedener Metalle. Für verschiedene Bodensorten wird die Zusammensetzung angegeben; es wird erörtert, auf welchem Wege die Metallspuren zur Wirkung kommen. K. Hinsberg.

Natriumbestimmung in biologischem Material. *Zur schnellen Bestimmung von Natrium im Serum* empfehlen H. J. Suderman und G. E. Delory[3] die *Fällung als Natriumzinkuranylacetat* und die darauffolgende Behandlung des Niederschlags mit *Salicylatlösung*. Das Uran geht als tief orange gefärbter Komplex in Lösung, dessen

[1] J. pharmac. Soc. Japan **72**, 1240—1245 (1952). Univ. Tokyo.

[2] Analyst (London) **77**, 629—642 (1932). Univ. Bristol Res. Station, Long Ashton, Bristol (England).

[3] Canad. J. med. Sci. **30**, 302—307 (1952).

Farbstärke dem Beerschen Gesetz gehorcht. *Ausführung.* 0,5 ml Serum werden mit 10 ml 10%iger Trichloressigsäure enteiweißt. Im Filtrat erfolgt in üblicher Weise die Natriumfällung. Nach dem Zentrifugieren und Waschen mit 95%igem Alkohol (mit Natriumzinkuranylacetat gesättigt) nimmt man den Niederschlag mit 1 ml 10%iger Natriumsalicylatlösung und 14 ml Wasser auf und mißt die Farbintensität bei 460 mμ. Ein Leerwert und die Untersuchung einer bekannten NaCl-Lösung werden gleichzeitig angesetzt. Die Werte stimmen mit den Ergebnissen des gravimetrischen Verfahrens im Mittel auf etwa 1% überein, im Vergleich mit der flammenphotometrischen Methode kommen Schwankungen von +19 bis −10% vor. K. Hinsberg.

Die Schnellbestimmung von Natrium in biologischen Flüssigkeiten mit Uranylmagnesiumacetat hatte P. Trinder[1] bisher colorimetrisch zu Ende geführt. Neuerdings schlägt derselbe Verf. dazu ein maßanalytisches Verfahren vor[2]. Hierbei reduziert man das in Lösung bleibende überschüssige sechswertige Uran mit Chrom(II)-chlorid zum vierwertigen Uran, überführt den Cr^{++}-Überschuß durch Luftsauerstoff in Cr^{3} und titriert das Uran mit Cer(IV)-ammoniumsulfatlösung. *Ausführung.* Das Chrom(II)-chlorid bereitet man durch Reduzieren von Chrom(III)-chlorid mit Zinkamalgam auf folgende Weise. In einem Scheidetrichter schüttelt man 12 g Zinkpulver mit 50 ml Quecksilber und 5 ml 4 n Schwefelsäure, bis sich das Zink im Quecksilber gelöst hat, und bewahrt die untere Schicht von Zinkamalgam in einer Flasche unter 5 ml n Schwefelsäure auf. Von einer 2 n salzsauren Lösung von 125 g Chromalaun in 500 ml (= 0,5 n) schüttelt man 25 ml in einer Flasche mit 10 ml Zinkamalgam und 15 ml Benzin durch, bis die mittlere (wäßrige) Schicht klar blau (von Cr^{++}) geworden ist. Unter dem Benzin und im Kühlschrank hält sich die Cr^{++}-Lösung längere Zeit, kann sonst aber auch leicht durch Schütteln mit der darunterliegenden Amalgamschicht regeneriert werden. Zur Natriumbestimmung fällt man wie üblich mit alkoholhaltiger Uranylmagnesiumacetatlösung und zentrifugiert. Von der überstehenden Flüssigkeit versetzt man 4 ml mit 10 ml einer Mischung von 20 ml konz. Schwefelsäure, 1000 ml Wasser und 10 ml 0,05%iger wäßriger Neutralrotlösung und gibt tropfenweise Cr^{++}-Lösung hinzu, bis die Farbe von rosa über graublau nach apfelgrün umschlägt. Durch Schütteln an der Luft bringt man die Farbe nach graublau zurück (Cr^{++}-Überschuß → Cr^{3}). Sodann versetzt man mit 1 ml 5%iger Eisenalaun- und 0,5 ml 0,1%iger Bariumdiphenylaminsulfonatlösung und titriert mit 0,01 n Cer(IV)-ammoniumsulfatlösung in n Schwefelsäure auf einen dunklen Purpurfarbton. In gleicher Weise führt man eine Blindbestimmung ohne Natrium durch. Die Differenz beider Werte entspricht dem vom Natrium in der Analysenprobe gebundenen Uran. 1 Na entspricht 3 U bzw. 6 H. Auf Cerebrospinalflüssigkeit, Serum oder Plasma kann man die Methode ohne weiteres anwenden, da Glucose und Harnstoff nicht stören. Harn muß man vorher mit 250 mg Calciumhydroxydpulver auf 5 ml vom Phosphat befreien; außerdem muß man bei der Blindbestimmung vor dem Zutropfen der Cr^{++}-Lösung 0,08 ml phosphatfreien Harn hinzufügen, um einen geringen Mehrverbrauch an Cer(IV)-ammoniumsulfat durch Harnbestandteile auszugleichen. F. Neumann.

R. J. Mora-Lara, Gabriela Morreale-de Castro und F. Escobar-Del Rey[3] bevorzugen die colorimetrische Methode, die auf der *Fällung als Natriumzinkuranyl-*

[1] Analyst (London) **76**, 596 (1951); vgl. diese Z. **137**, 319 (1952/53).

[2] Analyst (London) **78**, 180—183 (1953). Royal Infirmary, Sunderland, Co., Durham (England).

[3] Laboratorio (Granada) **15**, 1—10 (1953). Inst. Nac. Ciencias Médicas (C.S.J.C.), Secciòn de Granada (Spanien).

acetat und Farbbildung mit $K_4Fe(CN)_6$ beruht[1]. Man muß in verdünnten Lösungen (0,02—0,2 mg Na/ml) arbeiten. Für größere Natriummengen oder um eine Verdünnung zu vermeiden, eignet sich die Bestimmung nach A. A. Albanese und M. Lein[2], für welche eine etwas modifizierte Arbeitsweise angegeben wird.

Irmgard Schweitzer.

Für die spektrophotometrische Bestimmung von Kupfer im Serum mit Diäthyldithiocarbaminat schlägt E. Zuckerkandl[3] folgende zwei Arbeitsweisen vor *Ausführung I.* Das mit bidest. Wasser verdünnte *Serum* soll 4—15 μg Cu/ml enthalten. 0,5 ml dieser Lösung werden mit 3,5 ml Reagenslösung A (25 ml Äthylenglykol + 50 ml absoluter Alkohol + 0,3 ml 30%ige NaOH-Lösung + 75 mg Natriumdiäthyldithiocarbaminat) versetzt und nach dem Mischen im Beckman-Spektrophotometer Mod. DU in 10 mm-Küvetten bei 434 mμ gegen Kompensationslösungen, eine mit 0,5 ml bidest. Wasser + 3,5 ml Reagens A und die andere 0,5 ml verdünntes Serum + Reagens A (ohne Natriumdiäthyldithiocarbaminatzusatz) gemessen. Der Kupfergehalt errechnet sich aus folgender Formel: $D = d_a + d_r - (d_1 + d_2)$ worin D die Durchlässigkeit für den Cu-Gehalt, d_a die Durchlässigkeit des Mittelwertes von 3 Proben und d_r die optische Differenz der Küvetten mit Lösungsmittel ohne Reagens, d_1 und d_2 die Durchlässigkeiten der beiden Kompensationslösungen darstellen. *Ausführung II.* Man verfährt wie bei I, nur verwendet man 3,5 ml einer Reagenslösung B (2 Teile Glycerin + 1 Teil Benzylalkohol werden mit Natriumdiäthyldithiocarbaminat 0,1%ig in bezug auf dieses Salz gemacht). Man versetzt die Lösung mit 2 Tropfen 1 n Schwefelsäure, schüttelt gut durch und mißt bei 436 mμ. Das Lambert-Beersche Gesetz ist von 0—1,25 μg Cu/ml für beide Methoden erfüllt. Die Empfindlichkeit liegt bei 0,01 μg Cu ml, der relative Fehler beträgt ± 1%. Die Kupferbestimmungen der verschiedenen Seren von Schalentieren und Mollusken im Vergleich zu alten Methoden zeigen gute Übereinstimmung.

H. Pohl.

Zur Bestimmung von Gold in biologischem Material (nach Behandlung mit goldhaltigen Präparaten) entwickeln S. Natelson und J. L. Zuckerman[4] ein Verfahren, mit dem noch 0,2 μg Au auf folgender Grundlage erfaßt werden können: Das zu untersuchende Material (Blut, Serum, Gewebe, Faeces) wird mit etwas Schwefelsäure in einem Muffelofen bei 550° C verascht. Etwa zurückgebliebene Kohle wird mit Salpetersäure oxydiert, diese wird durch Abrauchen mit Salzsäure entfernt. Den Rückstand nimmt man mit Salzsäure-Bromwasser auf und fällt dann das Gold nach Zugabe von Tellur(IV)-chlorid mit Zinn(II)-chloridlösung. Das mitausfallende Tellur dient als Sammler. Nach dem Zentrifugieren wäscht man den Rückstand mit Salzsäure, löst dann in Königswasser, verdampft zur Trockne, nimmt mit 0,1 n Salzsäure auf, fügt 0,015%ige alkoholische Lösung von p-Diäthylaminobenzalrhodanin zu und mißt die entwickelte Farbe bei 500 mμ. Das Beersche Gesetz ist bis zur Sättigung der Lösung mit dem gefärbten Komplex erfüllt. Die Sättigung wird schon bei einem Goldgehalt von 1 μg ml erreicht. In Zusatzversuchen bei Serum oder Blut wurde zugefügtes Gold (0,5—4,0 μg) zu 96—101% wiedergefunden. Zu untersuchenden *Urin* kocht man mit konz. Salzsäure und fällt dann unmittelbar mit $TeCl_4 - SnCl_2$. Die weitere Behandlung ist wie oben. Die Originalarbeit enthält genaue Arbeitsvorschriften.

A. Kurtenacker.

[1] King, Microanálisis bioquí. en Medicina, Ed. Cientifico Médica, Barcelona 1948.

[2] J. Lab. clin. Med. **33**, 246 (1948); vgl. diese Z. **137**, 319 (1952/53).

[3] Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **34**, 1164—1173 (1952). Station biologique, Roscoff, Finistère (Frankreich).

[4] Analyt. Chemistry **23**, 653—655 (1951). Jewish Hosp., Brooklyn, N. Y. (USA).

Die colorimetrische Bestimmung des Serum-Calciums läßt sich nach M. U. Tsao[1] mit Hilfe von *2.3.4-Trioxybenzoesäure* in alkalischer Lösung durchführen[2]. Man verdünnt zuerst 0,5 ml Serum mit 3 Vol. Wasser, fällt mit 0,5 ml gesättigter Ammoniumoxalatlösung und kann bereits nach 15 min zentrifugieren, wenn die Ansätze auf 56° C erwärmt werden. Vor dem Zentrifugieren läßt man auf Zimmertemperatur abkühlen und verdünnt mit einer Lösung, die 0,05 ml Triäthanolamin im Liter Wasser enthält. Durch Zusatz von 6 Tropfen 95%igem Alkohol wird das Schäumen verhindert. Nach dem Zentrifugieren wird die überstehende Flüssigkeit abgesaugt und der Niederschlag in der Wärme in 0,3 ml 4 n Schwefelsäure gelöst. Dann kühlt man auf Raumtemperatur, setzt 3 ml gesättigte Trioxybenzoesäurelösung zu und alkalisiert mit 0,15 ml 9 n Natronlauge. Auf die Oberfläche gibt man sofort 1 ml geschmolzenes Wachs, um den Luftsauerstoff fernzuhalten, und colorimetriert nach genau 5 min bei 620 mμ gegen Wasser. Die Ablesung erfolgt nach einer Standardkurve, die zwischen 6 und 18 mg% (20—90 μg) Calcium fast linear verläuft. Bei Zusatzversuchen werden von 8 mg% Calcium 7,36—7,64, von 4 mg% 3,81—4,2 wiedergefunden. Die Unterschiede gegenüber der titrimetrischen Methode sind nicht bedeutend. Es ist unbedingt notwendig, Luftsauerstoff fernzuhalten, weil sonst eine störende braune Farbe auftritt. K. Hinsberg.

Zur quantitativen Calciumbestimmung in Geweben und anderen histochemischen Präparaten verwendet L. K. Dahl[3] die *Anfärbung mit Alizarin S*. Magnesium stört die für Calcium spezifische Methode nicht. Man fixiert die Gewebeteile am besten durch 36stündige Behandlung mit 4mal gewechseltem 95%igem Alkohol, gefolgt von Stehen über Nacht in absolutem Alkohol und färbt dann mit einer 1%igen Alizarin S-Lösung in 0,1%igem Ammoniak (p_H-Endwert 6,3—6,5). Wird die Bestimmung auf Filtrierpapier ausgeführt, kann man bis zu 0,02—0,002 μg Ca/μl nachweisen. Bei Ausführung der Bestimmung auf Geweben ist die Methode 50mal empfindlicher. Folgende Salze in Konzentrationen von 0,01—10% stören die histochemische Calciumbestimmung nicht: $AlCl_3$, $KAl(SO_4)_2$, $Al(OH)_3$, KCl, $K_2Cr_2O_7$, KJ, $KHCO_3$, Na_2CO_3. Strontium, Barium, Beryllium, Blei und Cadmium geben die gleiche Färbung wie Calcium und stören infolgedessen. K. Brodersen.

Quecksilberspuren im Harn in der Größenordnung von 20 μg Hg im Liter bestimmt D. J. S. Gray[4] mit Dithizon nach der Reversionsmethode[5]. Hierzu schließt man 25 ml Harn oder weniger nach Verdünnen auf 50 ml mit 1 g Kaliumpermanganat und 10 ml mäßig verdünnter Schwefelsäure (1:1 Vol.) durch Kochen unter Rückfluß während 30 min auf. Sollte das Kaliumpermanganat nicht ausreichen, so gibt man weiteres in Portionen von 0,5 g nach und kocht jedesmal noch 30 min. Zuletzt entfärbt man den Permanganatüberschuß durch Aufkochen mit 1 ml Hydroxylaminhydrochloridlösung (50 g Salz + 50 ml Wasser) und verdünnt auf 100 ml. 25 ml dieser Lösung, die in bezug auf Schwefelsäure etwa 1,5 n ist, schüttelt man mit 10 ml einer Lösung von 5 mg Dithizon in 1 Liter Chloroform. Zeigt die Farbänderung des Dithizons sehr wenig Hg an, so fügt man die restlichen 75 ml Aufschlußlösung hinzu und schüttelt wieder. Ist umgekehrt der Hg-Gehalt zu hoch, so verdünnt man die Aufschlußlösung mit 1,5 n Schwefelsäure (+ 1 ml Hydroxylaminlösung für je 100 ml) und wiederholt das Ausschütteln mit 10 ml

[1] J. biol. Chemistry **199**, 251—257 (1952). Univ. Ann Arbor, Mich. (USA).

[2] Vgl. Okáč, A., u. J. Pech, Collect. Czechoslov. Chem. Commun. **13**, 400, 514 (1948).

[3] Proc. Soc. exp. Biol. Med. **80**, 474—479 (1952). Hospital des Rockefeller-Inst., New York.

[4] Analyst (London) **77**, 436—438 (1952). Nat. Chem. Res. Lab., Pretoria, Südafrika.

[5] Vgl. H. Irving, G. Andrew und E. J. Risdon, J. chem. Soc. (London) **1949**, 541; vgl. diese Z. **131**, 357 (1950).

Dithizonlösung. Man mißt die Lichtdurchlässigkeit der Dithizonlösung bei 620 mμ, entzieht ihr danach das Hg durch Ausschütteln mit 10 ml einer Reversionslösung, die im Liter 20,4 g Kaliumhydrogenphthalat und 60 g Kaliumjodid enthält und aus der man Spuren von elementarem Jod mit Thiosulfat und Schwermetalle durch Schütteln mit Dithizonlösung entfernt hat, und mißt wieder die Lichtdurchlässigkeit bei 620 mμ. Die Differenz beider Ablesungen ist dem Hg-Gehalt proportional (Eichkurve mit bekannten Hg-Mengen). F. Neumann.

Zur Quecksilberbestimmung in Luft und Harn gibt T. Dutkiewicz[1] zwei colorimetrische Verfahren an. — Das erste bedient sich des *Diphenylcarbazons* und stellt eine Verbesserung der Methode von A. Stock sowie von M. W. Aleksiejewa,

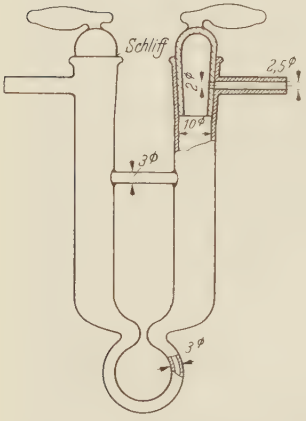


Abb. 1. Absorptionsröhrchen für Hg-Dämpfe nach T. Dutkiewicz.

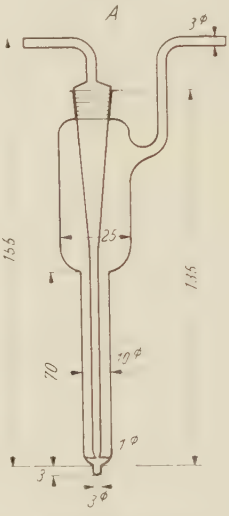


Abb. 2. Absorptionsröhrchen nach Poležaev.

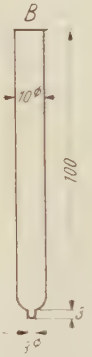


Abb. 3. Colorimeterröhrchen.

B. E. Andranow, S. S. Gruwic und A. S. Žitkowa[2] dar. Die zu untersuchende Luft wird durch eine U-Röhre (vgl. Abb. 1) mit einer Geschwindigkeit von 40 l Std gesaugt. Die Menge der Luft wird mit einem Gasmesser ermittelt. In der Biegung der Absorptionsröhre befinden sich Jodkristalle, deren Dämpfe sich mit den Quecksilberdämpfen zu Quecksilber(II)-jodid umsetzen. Das Absorptionsröhrchen taucht man dann in ein Wasserbad von 60—70° C und leitet reine Luft durch, um das überschüssige Jod zu entfernen. Das Quecksilber(II)-jodid bleibt im Röhrchen zurück. Nach dem Abkühlen leitet man 200 ml Chlor durch das Röhrchen, um das Jodid in Chlorid umzuwandeln, verdrängt das überschüssige Chlor durch reine Luft, löst das nun verbleibende Quecksilber(II)-chlorid in 5 ml 48 Vol°$_0$igem Äthylalkohol und fügt der Lösung 1 Tropfen gesättigte wäßrige Natriumacetatlösung zu. 3 ml der Lösung überträgt man in die Colorimeterzelle, setzt 2 Tropfen gesättigte alkoholische Diphenylcarbazonlösung zu und mißt die Extinktion bei 550 mμ gegen eine Blindlösung. Die Eichkurve wird mittels einer Lösung gewonnen, die 0,01 mg Hg je ml

[1] Med. Pracy Kwart. **3**, 257 (1952) [Polnisch].

[2] Oznaczenie szkodliwych substancji w powietrzu zakladów pracy. Warszawa 1951 (Bestimmung schädlicher Substanzen in der Luft von Arbeitsstätten).

48 Vol% igem Alkohol enthält. Dieses Verfahren liefert zwischen 0,0005 und 0,04 mg Hg (als $HgCl_2$) je 3 ml Lösung gute Werte. — *Das zweite Verfahren, das zur Hg-Bestimmung sowohl in Luft, als auch in Harn geeignet ist*, ist eine Modifikation der von N. G. Poležaev, V. V. Girina und T. G. Laktionova[1] angegebenen Arbeitsweise. Man fällt das Quecksilber in Form des Komplexes $CuJ \cdot HgJ_2$, dessen Färbung der Hg-Menge proportional ist. Die zu untersuchende Luft wird mit einer Geschwindigkeit von 40 l Std durch Absorptionsröhrchen (Abb. 2) geleitet, in denen sich je 1 ml Absorptionsflüssigkeit (enthaltend 2,5 g Jod und 30 g Kaliumjodid in 1 l Wasser) befindet. In Colorimetrierröhrchen nach Abb. 3 gibt man 0,2—0,8 ml der Sublimatstammlösung (0,1354 g $HgCl_2$ in 1 l Absorptionslösung, auf das 100fache mit dieser verdünnt), entsprechend 0,2—0,8 μg Hg und ergänzt diese Mengen auf 1 ml mit der Absorptionslösung. In jedes so vorbereitete Röhrchen gibt man 0,75 ml einer Lösung, die man wie folgt frisch bereitet: Zu 1 ml einer Lösung von 7 g $CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$ in 100 ml Wasser setzt man 4 ml 2,5 n Natriumsulfitlösung (33,3 g $Na_2SO_3 \cdot 7\,H_2O$ in 100 ml Wasser) und nach dem Verschwinden des Niederschlages 1,5 ml 8%ige $NaHCO_3$-Lösung. Den Inhalt der Colorimetrierröhrchen schüttelt man durch und läßt 10 min stehen. Der gebildete Niederschlag sammelt sich in der Ausbuchtung des Röhrchens. Die Absorptionslösung, durch die die zu untersuchende Luft geleitet wurde, behandelt man gleichartig. Man bringt die Lösung zunächst durch Zutropfen von 0,1 n Jodlösung genau auf die ursprüngliche Färbung und versetzt dann mit 0,75 ml des oben angeführten Lösungsgemisches. Nach dem Schütteln und 10 min langem Stehen vergleicht man die Färbung des entstandenen Niederschlages im auffallenden diffusen Licht mit der Farbskala der Niederschläge, die mit der Hg-Stammlösung erhalten wurden. Bei Abwesenheit von Hg ist der Niederschlag weiß. Im allgemeinen erfolgt völliges Abfangen der Hg-Dämpfe im ersten Absorptionsröhrchen; sonst muß die Färbung des Niederschlages im zweiten Röhrchen mit berücksichtigt werden. Die Fehler der Bestimmung sind abhängig von der Hg-Menge und betragen 25% bei 0,2 μg Hg und 5% bei 1 μg Hg. — *Für die Ermittlung im Harn* gibt man zu 100 ml Harn in einem Erlenmeyer-Kolben 1 ml Bromkresolgrünlösung (0,1 g Farbstoff, 14,3 ml 0,01 n Natronlauge, auf 250 ml mit Wasser verdünnt) und säuert mit 5%iger Essigsäure an. Dann fügt man portionsweise 0,25 g Natriumchlorid und nach dessen Auflösung 1,25 ml frische Hühnereiweißlösung (1 T. Eiklar mit 3 T. 0,9%iger Natriumchloridlösung vermischt) zu. Den Erlenmeyer-Kolben taucht man in ein siedendes Wasserbad und erwärmt 30 min lang unter häufigem Umrühren. Sobald das Eiweiß gerinnt und ausfällt, nimmt man den Kolben vom Wasserbad und filtriert durch einen Büchner-Trichter mit doppeltem Filter. Der Niederschlag wird quantitativ aus dem Kolben auf die Filter gebracht und 2—3mal mit heißem Wasser gewaschen. Beide Filter überträgt man in eine Schale, so daß der Niederschlag oben bleibt und läßt ihn bis zum nächsten Tag trocknen. Dann fügt man 5 ml 0,6%iger Jodlösung zu, knetet den Niederschlag 15 min lang gut durch, dekantiert die Jodlösung in ein Reagensglas und überträgt 1 ml davon in das Colorimeterröhrchen. Hierauf verfährt man wie schon beschrieben. H. Freytag.

Das Verfahren der Kohlenmonoxydbestimmung im Blut nach P. V. Harper[2] beruht auf folgenden Reaktionen: Versetzt man ein Gemisch von Oxyhämoglobin (HbO_2) und CO-Hämoglobin (HbCO) mit $Na_2S_2O_4$, so wird das HbO_2 sofort zu $Hb(Fe^{++})$ reduziert, HbCO wird dagegen nicht angegriffen. Setzt man dann einen Überschuß an $K_3Fe(CN)_6$ zu, so wird das reduzierte Hb augenblicklich in Methämoglobin (MeHb) übergeführt, während HbCO erst in einigen Minuten folgt. Man mißt

[1] Gig. i San. (Hyg. u. Sanitätswes.) **1951**, H. 8, 15; vgl. diese Z. **137**, 134 (1952/53).

[2] J. Labor. clin. Med. **40**, 634—640 (1952). Univ. Chicago, Ill. (USA).

also unmittelbar nach Zusatz von Cyanoferrat(III) und erhält die optische Dichte der Mischung von MeHb und HbCO. Liest man nach einigen Minuten wieder ab, so erhält man den Gesamtfarbstoff als MeHb. Die Differenz gibt an Hand einer Eichkurve den HbCO-Gehalt. Die Reaktionen hängen vom p_H-Wert ab. Als günstigster Wert erwies sich p_H 7,2. Die Messung erfolgt bei 632 mμ, wo HbCO eine niedrige Absorption zeigt, MeHb aber ein Maximum besitzt. Die Farben sind zwischen 18° und 31° C vollkommen beständig; sie gehorchen dem Beerschen Gesetz bis zu Konzentrationen von 1 g Hb/l in etwa 1:200 verdünntem Vollblut. Mit der neuen Methode können CO-Gehalte bis zu 20 Vol% erfaßt werden. Man benötigt für eine Bestimmung nur 0,05 ml Blut. Die Abweichung der Resultate von denen der gasometrischen van Slyke-Methode liegt zwischen $\pm$ 0,1—0,03 Vol%. Störungen durch unvollständige Hämolyse, Bilirubin, Evansblau, lipemisches und gelbsüchtiges Serum wurden nicht beobachtet. — In der Originalarbeit findet man eine ausführliche Arbeitsvorschrift, die sich zur kurzen Wiedergabe nicht eignet. H. Pohl.

Für die colorimetrische Rhodanidbestimmung im Blut gibt F. Goldstein[1] folgende Arbeitsvorschrift: Man versetzt das Gemisch von 1 ml Blut und 1 ml Wasser tropfenweise bis zu einem Volumen von 25 ml mit Alkohol, filtriert und mischt 10 ml des Filtrates mit 1 ml Eisen(III)-reagens [bestehend aus 50 g Eisen(III)-nitrat, 500 ml Wasser und 525 ml konz. Salpetersäure]. Man filtriert nochmals von neu ausgefallenen geringen Eiweißspuren und mißt die rote Farbe im Filtrat nach 5 min. Die Farbe bleicht im Licht rasch aus, ist aber im Dunkeln oder im Dämmerlicht ziemlich beständig. 25—400 μg Rhodanid können auf $\pm$ 2,5% genau bestimmt werden. K. Hinsberg.

Zum Nachweis von Nitrit bei Harninfektionen oder in der Bakteriologie empfiehlt E. Dannenberg[2] ein Nitrit-Trockenreagens, bestehend aus einem Gemisch von 0,1 g α-Naphthylamin, 0,5 g Sulfanilsäure und 6 g Weinsäure. Gibt man 1 Messerspitze des Pulvers zu einigen ml einer nitrithaltigen Flüssigkeit, so zeigt sich nach einigen Minuten eine rosa Färbung. Zur Kontrolle wird ein „Pantest" vorgeschlagen, der 1—5% Natriumnitrit auf Seesand enthält, und der es gestattet, die Reaktion zu demonstrieren und die Wirksamkeit des Reagenses zu prüfen.
K. Hinsberg.

Nitrat in Körperflüssigkeiten (Plasma, Urin) bestimmen W. R. Straughn, Inez G. Travis und E. P. Hiatt[3] durch enzymatische Reduktion von Nitrat zu Nitrit, Überführung von Nitrit in ein Diazoniumsalz, Bildung eines Azofarbstoffs und dessen colorimetrische Bestimmung. Als Nitratasequelle dienen Zellsuspensionen von Escherichia coli. Man impft Pepton-Agarplatten oder besser 1%ige Peptonlösungen mit dem Mikroorganismus, läßt 16—18 Std bei 37° C (bei der Lösung unter künstlicher Belüftung) wachsen, spült die Kolonien von den Platten mit 0,067 m Phosphatpufferlösung (p_H 6,0) ab bzw. zentrifugiert die Peptonlösung, wäscht und suspendiert in Pufferlösung (p_H 6,0), wobei 1 ml Suspension 0,20—0,25 mg Bakterientrockenmasse enthalten soll. — *Nitratbestimmung.* In ein 15 ml-Zentrifugenglas gibt man 2 ml der zu untersuchenden Lösung mit einem (nötigenfalls durch Verdünnung einzustellenden) Gehalt von 0,01—0,07 Milliäquivalent Nitrat im Liter, fügt 1 ml 0,067 m Natriumformiatlösung in 0,067 m Phosphatpuffer (p_H 6,0), 1 ml einer 2%igen Lösung von Natrium-p-aminohippurat (oder einer anderen zur

[1] J. biol. Chemistry **187**, 523—527 (1950). Jefferson Med. Coll., Philadelphia (USA).
[2] Münchener med. Wschr. **1953**, 608. Hospital Mixto, Santiago del Estero (Argentinien).
[3] J. Lab. clin. Med. **41**, 157—160 (1953). Univ. North Carolina, Chapel Hill, N.C., (USA).

Bildung von Diazoniumsalz fähigen Verbindung) und 1 ml Zellsuspension hinzu und läßt 30 min in einem Wasserbad von 37° C stehen. Danach säuert man mit 1 ml 1,2 n Salzsäure an und zentrifugiert die Bakterien ab. Zu 4 ml der überstehenden klaren Flüssigkeit gibt man 1 ml einer 0,1%igen Lösung von N-(1-Naphthyl)-Äthylendiamindihydrochlorid (oder einer anderen Kupplungskomponente), läßt wenigstens 5 min stehen und mißt die Farbstärke bei 540 mμ. Die Beziehung von Farbe und Nitratmenge ist von 0,01—0,07 Milliäquiv. Nitrat im Liter geradlinig, außerhalb dieses Bereiches aber nicht. Die Nitrataseaktivität verschiedener Ansätze von Bakterien schwankt etwas, weshalb man sicherheitshalber Proben von bekanntem Nitratgehalt mit den unbekannten mitlaufen läßt. Unter den Analysenbedingungen ergeben Versuche mit reinem Nitrat ($NaNO_3$) 85 - 90% der Farbstärke, die mit äquivalenten Mengen Nitrit ohne enzymatische Reduktion entsteht. F. Neumann.

Anorganisches Phosphat in biologischem Material. *Für die mikrocolorimetrische Bestimmung von anorganischem Phosphor als Molybdänblau in Serum, Urin und Stuhlasche* benutzen Hertha H. Taussky, E. Shork und Gloria Kurzmann[1] Eisen(II)-sulfat als Reduktionsmittel, wie schon früher von J. B. Sumner[2] vorgeschlagen wurde. Es bietet den Vorteil, daß die Färbung sich innerhalb 1 min entwickelt und daß geringere Säuremengen als bei anderen Reduktionsmitteln notwendig sind, so daß labile Phosphorsäureester nicht angegriffen werden[3]. 2—40 μg Phosphor können so bestimmt werden. — *Ausführung der Bestimmung in Serum.* 0,2 ml Serum werden zu 3,5 ml 12%iger Trichloressigsäure in ein Zentrifugenglas pipettiert, nach Umrühren und 10 min langem Stehen wird 10 min zentrifugiert. 3 ml der überstehenden Flüssigkeit werden in eine colorimetrische Zelle pipettiert und 2 ml des Molybdat-Eisen(II)-sulfatreagenses hinzugefügt. Das Reagens stellt man her, indem man 50 g $(NH_4)_6\,Mo_7O_{24} \cdot 4\,H_2O$ in 10 n Schwefelsäure zu einem Volumen von 500 ml löst, 10 ml dieser Lösung mit Wasser auf 70 ml verdünnt, mit 5 g $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ versetzt und mit Wasser auf 100 ml auffüllt. Im Zeitintervall von 1 min bis 2 Std nach Zusatz des Reagenses liest man die Intensität der Färbung in einem Klett-Summerson-Colorimeter mit dem Filter Nr. 66 ab und vergleicht mit einer unter den entsprechenden Bedingungen erhaltenen Eichkurve. Diese ist für 1—40 μg eine Gerade. Ein Blindwert für die Reagenzien wird abgezogen. Für *Urin, Rückenmarksflüssigkeit* und *Stuhlasche* werden die Bestimmungen entsprechend durchgeführt; man bemißt die zu analysierende Menge so, daß 2—40 μg Phosphor vorliegen. Auch *Phosphatasen* können nach geeigneter Vorbehandlung im Serum bestimmt werden. Der Einfluß der Säuremengen und der Molybdatkonzentration sowie von anderen eventuell störenden Substanzen wurden untersucht und die Ergebnisse dieser Methode mit der nach Fiske-Subbarow verglichen. Einzelheiten findet man im Original. Barbara Grüttner.

Zur Schnellbestimmung von Mikromengen von 1—10 μg Phosphor in biologischem Material modifizierte G. R. Nakamura[4] die colorimetrische Mikromethode von E. J. King[5]: In einem 10 × 75 mm-Röhrchen, das mit einer 1 ml-Marke versehen ist, gibt man zu der Einwaage der zu prüfenden Probe 0,1 ml von 60 bis 70%iger Perchlorsäure und erhitzt im Sandbad vorsichtig auf 190—200° C bis zur

[1] J. biol. Chemistry **202**, 675—685 (1953). Cornell Univ. Med. College und New York Hospital, New York.

[2] Science **100**, 413 (1944).

[3] Vgl. auch M. Rockstein und P. W. Herron, Analyt. Chemistry **23**, 1500 (1951); vgl. diese Z. **136**, 48 (1952).

[4] Analyt. Chemistry **24**, 1372 (1952). Univ. Berkeley, Calif. (USA).

[5] Biochemic. J. **26**, 292 (1932); vgl. diese Z. **97**, 288 (1934).

Entfärbung. Ist diese nach 15 min noch nicht eingetreten, so fügt man bei weiterer Erhitzung während 5 min einen Tropfen 30%iges Wasserstoffperoxyd zu. Zu der abgekühlten, mit Wasser auf 0,5 ml verdünnten Lösung fügt man 0,1 ml 5%ige Ammoniummolybdatlösung sowie 0,1 ml Sulfonsäuremischung (wäßrige Lösung, 0,2% 1,2,4-Aminonaphtholsulfonsäure, 12% Natriumhydrogensulfit und 2,4% Natriumsulfit enthaltend) zu und füllt zur 1 ml-Marke mit Wasser auf. Die entstandene Blaufärbung mißt man im Spektrophotometer bei 700 mμ und vergleicht mit Standardlösungen. H. Zellner.

Zur Bestimmung von anorganischen Serumphosphaten greift B. N. Horwitt[1] auf frühere Arbeiten zurück. Es erfolgt der übliche Zusatz von Ammoniummolybdat und Reduktion des Phosphormolybdänsäurekomplexes mit Zinn(II)-chlorid. Die Farbe soll mindestens 25 min beständig sein. Es ist noch 1 μg Phosphor bestimmbar. Das zu untersuchende Serum wird zunächst mit Trichloressigsäure enteiweißt.

Um den Anteil an primärem Phosphat im Harn zu bestimmen, geben H. Hungerland, D. Stach und H. Weber[2] ein Nomogramm an, nach welchem aus der Titrationsacidität nach Henderson und dem p_H-Wert des Harnes der Gehalt an primärem Phosphat in mÄqu./l abgelesen werden kann. K. Hinsberg.

Zur Bestimmung von Natriumthiosulfat und p-Aminohippursäure im Nierenclearencetest verfährt man nach N. Kalant und C. S. McArthur[3] wie folgt: Man enteiweißt 1 ml Plasma (5—30 mg% Thiosulfat enthaltend) mit Wolframatschwefelsäure, zentrifugiert und titriert die klare Lösung nach Zugabe von KJ und Stärkelösung mit 0,01 n Jodlösung aus einer Mikrobürette. Ein Plasmablindwert ist abzuziehen. Selbst hohe Konzentrationen von p-Aminohippursäure (A) stören nicht. Die Bestimmung in verdünntem Urin erfolgt entsprechend. — Zur Bestimmung von A enteiweißt man 0,2 ml Blut mit 3,2 ml 3%iger $Na_2SO_4 \cdot 10\ H_2O$-Lösung, 0,3 ml 10%iger $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$-Lösung und 0,3 ml 0,5 n Natronlauge. 2 ml des Zentrifugats diazotiert man, kuppelt mit N-(1-Naphthyl)-äthylendiaminhydrochlorid und photometriert. Die Eichkurve wird mit A-Lösungen aufgestellt, die 25—350 μg A ml enthalten. A. Kurtenacker.

Zur Mikrobestimmung von Chrom im Blut verwenden H. J. Cahnmann und Ruth Bisen[4] die empfindliche Reaktion mit Diphenylcarbazid nach Überführen in Chromat durch alkalische Schmelze. Es lassen sich so noch 0,01—0,1 Teile Cr je Million Teile Probe nachweisen. Zu allen Reaktionen muß doppelt destilliertes Wasser genommen werden. Bis 2 ml Blut können trocken verascht, bis 30 ml müssen durch nasse Veraschung verarbeitet werden. Zur Trockenveraschung wird 1 ml Blut im Platintiegel eingedampft, bei 100—110° C getrocknet, und dann im Muffelofen auf 250—525° C erhitzt. Schließlich wird die Temperatur von 525—540° C 40 min lang eingehalten. Zur nassen Veraschung setzt man im Kjeldahl-Kolben 3 ml Salpetersäure zur Probe zu, nach einigem Stehen 0,5 ml H_2O_2, läßt einige Minuten stehen und erhitzt dann vorsichtig, bis die Säuredämpfe verschwinden und die Lösung klar geworden ist. Zum Schluß dampft man nochmal mit 1 ml Salpetersäure ab, und erwärmt in einem Muffelofen über Nacht auf 500° C, läßt abkühlen, raucht dann nochmal mit 1 ml Salpetersäure ab, gibt 6 ml konzentrierte

[1] J. biol. Chemistry **199**, 537—541 (1952). Tulane Univ. and Alton Ochsner Med. Foundat., New Orleans, Louis. (USA).

[2] Naturwissenschaften **40**, 20 (1953). Justus-Liebig-Hochschule Gießen.

[3] J. Lab. clin. Med. **35**, 836—841 (1950). Univ. Toronto (Canada).

[4] Analyt. Chemistry **24**, 1341—1345 (1952). Cancer Inst., Nat. Inst. Health, Bethesda, Md. (USA).

Salzsäure und 3 Tropfen H_2O_2 zu und dampft wieder ein. Zum Schluß wird mit Wasser ausgespült und in einem Platintiegel eingedampft. Zum Rückstand der trockenen Veraschung gibt man 1 ml Wasser, 200 mg Natriumkaliumcarbonat und 20 mg Kaliumchlorat. Im Falle der nassen Veraschung wird mit Ammoniakwasser statt mit reinem Wasser aufgenommen. In beiden Fällen dampft man bei 100° C zur Trockne und schmelzt schließlich im Muffelofen bei 400—750° C. Die kalte Schmelze wird mit 1 ml doppelt destilliertem Wasser aufgenommen, in ein Zentrifugenglas gebracht und zentrifugiert, um Eisenoxyd niederzuschlagen. Die überstehende Flüssigkeit und die Waschwasser (0,3%ige NaCl-Lösung) des Niederschlages werden mit 0,5 ml 25%iger Schwefelsäure angesäuert, dann mit 0,5 ml Diphenylcarbazidlösung versetzt, auf 10 ml aufgefüllt, worauf man die Farbe bei 543 mμ gegen einen Leerwert mißt. Das Diphenylcarbazidreagens besteht aus 1 g Phthalsäureanhydrid in 95%igem Alkohol, 62 mg Diphenylcarbazid, aufgefüllt mit Alkohol auf 25 ml. Ein Leerwert wird in der gleichen Weise angesetzt. Bei der Farbentwicklung ist der optimale p_H-Wert 1,5—1,6. Oberhalb p_H 1 bleicht die Farbe sehr schnell aus, unterhalb p_H 2 ist die Entwicklung sehr verzögert. Bei Zusatzversuchen zwischen 0,2 bis 3,2 μg Cr zu Blut werden 93—94% wiedergefunden mit einer Standardabweichung von 0,05—0,06 μg. K. Hinsberg.

Die Bestimmung von Chromoxyd in Fäces oder Nahrungsmitteln wird von D. W. Bolin, R. P. King und E. W. Klosterman[1] nach Oxydation colorimetrisch durchgeführt: 100—500 mg der gesiebten Probe, die 1—5% Cr_2O_3 enthält, wird in einem trockenen Kjeldahl-Kolben mit 5 ml eines Oxydationsgemisches versetzt, das man durch Lösen von 10 g Natriummolybdat in 150 ml Wasser und Zufügen von 150 ml konz. Schwefelsäure und 200 ml 70—72%iger Perchlorsäure erhält. Man erhitzt mit einem Mikrobrenner bis die Lösung klar ist, kühlt etwas ab, fügt 50 ml Wasser hinzu und füllt bei Zimmertemperatur auf 100 ml auf. Nach Absitzen der Kieselsäure colorimetriert man mit 440 mμ-Filter gegen Wasser. Man stellt eine Standardkurve mit bekannten Mengen Cr_2O_3 auf; wenn die Durchlässigkeit mehr als 30% beträgt, gilt das Lambert-Beersche Gesetz. Die Methode wurde an verschiedenen Proben von Cr_2O_3-haltigen Fäces und Nahrungsmitteln ausprobiert, sie geht rasch und ist genau. Wenn man nicht mehr als 500 mg Probe oxydiert, treten keine Explosionen beim Aufschluß auf. Barbara Grüttner.

Zur Bestimmung von kleinen Mengen Molybdän und Wolfram nach dem Dithiolverfahren vorwiegend in biologischem Material, schlagen Shirley H. Allen und M. B. Hamilton[2] folgende Arbeitsweise vor: Aus der zu untersuchenden Lösung wird ein Teil der störenden Metalle (Cu, Bi usw.) durch Extraktion mit Dithizonlösung bei p_H 3,0 entfernt, dann versetzt man in schwefelsaurer Lösung mit Kupferron und extrahiert die Komplexe von Molybdän und Wolfram mit Isoamylalkohol. In der nun von störenden Stoffen freien Lösung wird der Molybdändithiolkomplex in 6 n bis 14 n Schwefelsäure bei Raumtemperatur erzeugt und mit Petroläther extrahiert. Unter diesen Umständen entsteht der Molybdänkomplex quantitativ, während die Bildung des Wolframkomplexes vollständig unterbleibt. Zur Wolframbestimmung wird die wäßrige Phase auf p_H 0,5—2,0 eingestellt und der Wolfram-Dithiolkomplex bei 90—95° C erzeugt. Das Beersche Gesetz ist von 5—15 μg Mo und 10—30 μg W in 6,5 ml Petroläther bei 680 mμ (Mo) bzw. 630 mμ (W) erfüllt. Fremde Metalle stören kaum. 20 μg W bzw. 10 μg Mo können noch in Gegenwart von 200 μg Sn, 7 mg Fe, 2 mg U, V, Zr oder 1 mg Ti genau bestimmt werden. — *Ausführung.* Die von den organischen Bestandteilen

[1] Science (Lancaster, Pa.) 116, 634—635 (1952). Agric. College, Fargo, N. Dak. (USA).
[2] Anal. Chim. Acta (Amsterdam) 7, 483—493 (1952). Univ. Adelaide (Süd-Austral.).

und Kieselsäure durch Abrauchen mit Salpetersäure, Schwefelsäure und Überchlorsäure befreiten Proben werden auf etwa 15 ml verdünnt und filtriert. Das Filtrat mit etwa 5—15 μg Mo und 5—30 μg W wird mit 10 ml 12%iger Ammoniumcitratlösung versetzt, gegen Bromphenolblau mit Ammoniak auf etwa p_H 3 eingestellt, auf 75 ml verdünnt und mit 0,1%iger Dithizonlösung in CCl_4 erschöpfend extrahiert. Die wäßrige Phase wird mit 35 ml Schwefelsäure (1:1) versetzt, abgekühlt und nach Zugabe von 1,5 ml 6%iger wäßriger Kupferronlösung mit 11 ml Isoamylalkohol 90 sec geschüttelt. Man läßt die Phasen absetzen und trennt danach ab. Zu jeder weiteren Extraktion mit 5,10 und 5 ml Isoamylalkohol gibt man noch jeweils 0,5 ml Kupferronlösung und vereinigt die Mo-W-Extrakte. Man destilliert den Alkohol ab und zerstört den organischen Rückstand durch Abrauchen mit $HNO_3/H_2SO_4/HClO_4$. Zur quantitativen Gewinnung des Molybdän-Dithiolkomplexes muß man nun etwa 0,5 mg Eisen zufügen (falls nicht bereits so viel Fe vorhanden ist). Man verdünnt auf 2—3 ml mit Wasser, kocht bis zur Klärung und filtriert in 25 ml-Schüttelzylinder, fügt zum Filtrat etwa 4—7 ml konz. Schwefelsäure zu, verdünnt auf genau 17 ml und versetzt mit 1 ml 0,3%iger Dithiollösung in 1%iger Natronlauge (1 g Dithiol in Ampulle wird bei etwa 35° C geschmolzen, in 300 ml warmer 1%iger NaOH-Lösung gelöst, schnell auf 20° C abgekühlt, unter Rühren mit soviel Thioglykolsäure versetzt, bis sich eine leichte bleibende Trübung bildet, in Ampullen gefüllt, verschmolzen und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Ampullen werden kurz vor Gebrauch geöffnet, die Lösung filtriert). Man läßt 1 Std bei 20° C stehen, schüttelt dann mit 6,5 ml Petroläther (Kp. 95—110° C) 3mal je 90 sec heftig und mißt die Farbe der ätherischen Lösung bei 680 mμ gegen einen ebenso behandelten Blindansatz. Die wäßrige W-haltige Lösung wird auf etwa 0,5 ml eingekocht, mit Ammoniak alkalisch gemacht, dann mit H_2SO_4 auf p_H 0,5—2,0 eingestellt und in einen 25 ml-Schüttelzylinder filtriert. Man verdünnt auf genau 18 ml, mischt mit 3 ml Dithiollösung 30 min lang im Wasserbad von 90—95° C. Nach dem Abkühlen auf 20° C extrahiert man durch 3maliges kräftiges Schütteln zu je 90 sec mit 6,5 ml Petroläther und mißt den Extrakt bei 630 mμ gegen einen Blindansatz. Die Eichkurven werden mit steigenden Mengen Mo- bzw. W-Testlösungen unter den gleichen Bedingungen aufgestellt. H. Pohl.

Fluor im Harn läßt sich nach den Angaben von R. F. Miller und P. H. Phillips[1] leicht und schnell bestimmen, wenn der Harn zuerst 15fach verdünnt wird. Von dieser Verdünnung nimmt man 25 ml, gibt 2 ml einer Silberperchloratlösung (1 g je ml), einige Glasperlen und 25 ml 75%ige Perchlorsäure zu. Man schließt eine Dampfdestillation bei 135,5° C an und kann im Destillat das Fluor wie üblich titrimetrisch bestimmen. Es ist nicht notwendig, den Harn zu veraschen, wie in Vergleichsanalysen gezeigt wird. Zugesetztes Fluor (etwa 100 μg als NaF) wurde in den veraschten und nicht veraschten Proben zu etwa 100 ± 4%, im Mittel zu 100,8 bzw. 98,2% wiedergefunden. K. Hinsberg.

Chlorbestimmung in biologischen Flüssigkeiten. P. H. Sanderson[2] hat die potentiometrische Mikrobestimmung in *Plasma* oder *Urin* nach dem Verfahren von J. Lehmann[3] abgewandelt. Er potentiometriert einfach am Silberdraht, verwendet aber an Stelle einer Kalomelelektrode mit Heber eine Platinelektrode, die nach H. H. Willard und A. W. Boldyreff[4] in den Auslauf der in die Lösung eintauchenden Mikrozulaufbürette eingeschmolzen ist und dann ein vorzüglich konstantes Potential liefert. Das Rühren erfolgt durch Einleiten von Luft, die Potentialmessung

[1] Analyt. Chemistry **25**, 172—173 (1953). Univ. Madison, Wisconsin (USA).
[2] Biochemic. J. **52**, 502—505 (1952). St. Mary's Hospital, London W. 2.
[3] Acta paediatrica (Stockholm) **26**, 258 (1939).
[4] J. Amer. chem. Soc. **51**, 471 (1929); vgl. auch diese Z. **140**, 264 (1953).

mittels eines elektronischen Millivoltmeters mit 5 Megohm Eingangswiderstand, das ausführlich beschrieben ist, das aber auch durch ein p_H-Meter ersetzt werden kann. — Zur Titration werden 0,2 ml Plasma in 5 ml 50%iger Essigsäure mit 1 bis 2 Tropfen Caprylalkohol versetzt (zur Vermeidung von Schaumbildung) und mit 0,1 n Silbernitratlösung aus der Mikrobürette titriert. Die Potentialeinstellungen sind so gut reproduzierbar, daß der Äquivalenzpunkt direkt aus der Anzeige, d. h. ohne Aufnahme der Titrationskurve abgelesen werden kann. Er liegt stets zwischen 190 und 200 mV. Größere Mengen (1 ml) liefern noch ausgeprägtere Anzeigen. Die Genauigkeit der Analyse ist sehr gut, wie Vergleiche mit der Methode nach D. D. VAN SLYKE und A. HILLER[1] mit Pikrinsäure zeigen. K. CRUSE.

Eine zuverlässige Methode zur potentiometrischen Bestimmung der Chloride im Harn, die eine Modifikation der NORTHROPschen Arbeitsweise[2] darstellt, wird von R. H. KELLOGG, W. R. BURACK und K. J. ISSELBACHER[3] beschrieben. Die Untersuchungslösung befindet sich in einem Trichter, dessen kurz abgeschnittenes Ansatzrohr mit Schlauch und Klemme verschlossen ist. Die Elektrolytlösung besteht aus einer Lösung von 0,25 m Ammoniumnitrat und 0,1 m Essigsäure, die Maßflüssigkeit aus 0,01 m Silbernitrat in der Elektrolytlösung. Indicatorelektrode ist ein Silberdraht. Die Titration erfolgt in der üblichen Weise und gibt nach Beleganalysen, die sich auf reine NaCl-Lösungen, Menschen- und Rattenurin, getrocknete Milchproben mit Zusatz von Kochsalz, Rinderserum mit und ohne Kochsalz erstrecken, ausgezeichnete Werte. Bei Urin z. B. ist die Übereinstimmung besser als 1%. Das Verfahren hat den Vorteil, daß man 20—30 Analysen in 1 Std durchführen kann.
K. HINSBERG.

J. HÜBENER und L. SCHMIDT[4] empfehlen *für die Chlorbestimmung im Blutserum* die elektrometrische Differenztitration mit $AgNO_3$-Lösung unter Verwendung von zwei Ag-AgCl-Elektroden, von welchen die eine frei in die zu titrierende Flüssigkeit taucht, die andere mit Paraffin in ein Glasrohr eingebettet ist, das erst mit seinem capillaren Ende in die zu titrierende Lösung taucht. Während der Titration bildet sich in bekannter Weise eine Potentialdifferenz zwischen beiden Elektroden aus, die im Äquivalenzpunkt ein Maximum erreicht. Nach jeder Ablesung wird die Flüssigkeit aus dem die zweite Elektrode umgebenden Glasrohr mit Stickstoff in das Titrationsgefäß gedrückt. Der Stickstoff dient auch zum Rühren. (Abbildung des Apparates in der Originalarbeit.) Die Elektroden bestehen aus 1 mm starkem Silberdraht, auf den AgCl aufgestreut und dann im Bunsenbrenner geschmolzen wird. Vor Gebrauch werden die Elektroden 8 Tage gewässert. *Ausführung.* 5 ml Blut werden 2 Std nach der Entnahme zentrifugiert, das Serum wird dekantiert und 50fach mit Wasser verdünnt. 30 ml der *frischen* Verdünnung werden mit 2 Tr. Schwefelsäure und 1 kleinem Tr. Octanol (um das Schäumen zu verhindern) versetzt und dann unmittelbar mit 0,01 n $AgNO_3$-Lösung titriert. Die Resultate sind auf $\pm$ 1% genau. A. KURTENACKER.

Das eiweißgebundene Jod im Serum läßt sich nach H. SOBEL und S. SAPSIN[5] in Anlehnung an die Methode von A. L. CHANEY[6] auf sehr einfache Weise bestimmen. 0,5 ml Serum werden zuerst mit 4 ml 1,25%iger Zinksulfat- und 0,5 ml 0,75 n NaOH-Lösung in üblicher Weise gefällt, zentrifugiert und der Niederschlag einmal mit

[1] J. biol. Chemistry **167**, 107 (1947).
[2] NORTHROP, J. H., J. Gen. Physiol. **31**, 213 (1948).
[3] Proc. Soc. exp. Biol. Med. **81**, 333—338 (1952).
[4] Hoppe-Seiler's Z. physiol. Chem. **289**, 67—71 (1952). Univ. Frankfurt/M.
[5] Analyt. Chemistry **24**, 1829—1831 (1952). Dep. Biochem., Cedars Lebanon Hospital, Los Angeles, Calif. (USA).
[6] Ind. Engng. Chem., anal. Edit. **12**, 179 (1940); vgl. diese Z. **139**, 72 (1953).

Wasser ausgewaschen. Der gewaschene Niederschlag wird dann in 4 ml 70%iger Schwefelsäure und 0,5 ml 60%iger Chromsäurelösung in einem Spezialgefäß von 22 mm Durchmesser und 140 mm Länge, welches oben einen Schliff trägt, verascht (Einzelheiten siehe im Original). Nach der Veraschung wird 1 ml 50%ige phosphorige Säure und Wasser zugesetzt, ein weiteres Destillationsrohr, welches in eine Capillare ausläuft, aufgesetzt und unmittelbar in ein Colorimetrierrohr, das 2 ml 1%ige Natronlauge enthält, destilliert. Die Destillation dauert genau 4,5 min. Das überdestillierte Jod wird in üblicher Weise mit arseniger Säure und Cer(IV)-sulfat bestimmt. Die Ergebnisse sind fast ebenso genau wir die Methode von CHANEY, aber der Vorgang ist viel einfacher und kürzer.

B. ZAK, H. H. WILLARD, G. B. MYERS und A. J. BOYLE[1] bestimmen das eiweißgebundene Jod durch *Oxydation mit Chlorsäure* auf folgende Weise: Das Chlorsäurereagens wird dargestellt, indem man 500 g Kaliumchlorat ($KClO_3$) in 900 ml destilliertem Wasser löst und unter ständigem Rühren langsam 375 ml 72%ige Perchlorsäure zusetzt. Nach 24 Std ist im Eisschrank $KClO_4$ ausgefallen; es resultiert eine gelbgrüne Lösung mit etwa 28% Chlorsäure, die nur 0,3 g/l Kalium enthält. Zur Eiweißfällung verwendet man 2—3 ml Serum und 25 ml 15%ige Trichloressigsäure, zentrifugiert nach 10 min, wäscht den Niederschlag mit Trichloressigsäure aus, gießt das Überstehende nach dem Zentrifugieren ab und gibt 1 ml 0,05%ige Natriumchromatlösung und 25 ml Chlorsäurereagens zum Niederschlag. Nach Zusatz von 15 oder 20 Glasperlen verdampft man langsam auf einer Heizplatte, bis noch rund 0,5 ml Flüssigkeit vorhanden sind und setzt dann tropfenweise Chlorsäure zu, falls das Chromat zu grünem Cr^{III} reduziert erscheint. Erfolgt das Eindampfen sehr rasch, so tritt leicht Reduktion des Chromates ein und es kann Jod verloren werden. In gleicher Weise werden einige Standardproben mit KJO_3 (168,5 mg/l, 10fach verdünnt) behandelt und zur Anlage eine Eichkurve benutzt. Die Trockenrückstände der Standardlösungen und der Serumproben werden in Wasser gelöst und auf 10 ml aufgefüllt. Man entnimmt davon 3 ml, setzt 2 ml 0,2 n arsenige Säure, die mit Schwefelsäure angesäuert ist, zu, erwärmt 20 min auf 30° C und gibt im Abstand von genau 1 min je 1 ml 0,1 n Cer(IV)-ammoniumsulfatlösung zu (200 ml 0,5 n Cer(IV)-sulfatlösung in m Schwefelsäure, 600 ml Wasser, 13,2 g Ammoniumsulfat, 83 ml konzentrierte Schwefelsäure, 1,8 g Natriumchlorid auf 1000). Die Entfärbung der Cer(IV)-lösung wird nach 20 eventuell 30 min gemessen und ist ein Maß für die vorhandenen Jod-Ionen, die als Katalysatoren wirken[2]. Die Messung erfolgt bei 420 mμ. Die Beleganalysen für zahlreiche Seren sind ausgezeichnet bei Zusatzversuchen zwischen 0,12 und 0,18 μg. Der Fehler wird mit $\pm$ 15% maximal angegeben. Die beschriebene Methode hat den besonderen Vorteil, daß sie die Destillation vermeidet und deshalb wesentlich an Arbeit spart. Die Eichkurve ist für alle neu bereiteten Reagenzien neu anzulegen. K. HINSBERG.

Die Bestimmung von Serumeisen und der Eisenbindungsfähigkeit wird von G. DAVIES, B. LEVIN und V. G. OBERHOLZER[3] mittels einer einfachen Methode durchgeführt. Man läßt 0,2 ml Serum mit 0,1 ml 6 n Salzsäure 10 min stehen und fällt dann mit 0,2 ml 20%iger Trichloressigsäurelösung. Vom Zentrifugat entnimmt man 0,37 ml, gibt dazu 0,05 ml 12 n NH_4OH-Lösung und 0,05 ml einer gesättigten Natriumacetatlösung, dann 0,01 ml o-Phenanthrolin (0,5%ig in 10%igem Äthylalkohol) und 0,3 mg Natriumdithionit, mischt gut, füllt auf 0,5 ml auf und mißt mit einem Ilford-Filter 604. Durch den Salzsäurezusatz wird das Gesamteisen aus der Eiweißbindung abgespalten. Um die *Eisenbindungsfähigkeit* zu bestimmen, gibt

[1] Analyt. Chemistry **24**, 1345—1348 (1952). Wayne Univ. Detroit, Mich. (USA).
[2] Vgl. u. a. diese Z. **137**, 72 (1952).
[3] J. Clin. Path. **5**, 312—316 (1952). Queen Elizabeth Hosp. f. Children, London.

man zu 0,2 ml Serum 0,025 ml einer frisch reduzierten Eisenlösung (50 μg Fe/ml), 0,01 ml o-Phenanthrolinlösung und dann 0,3 mg Natriumdithionit. Die Lösung wird durch Anklopfen gut geschüttelt, nach 1 Std entnimmt man 0,2 ml, gibt 0,15 ml 6 n Salzsäure und 0,1 ml destilliertes Wasser zu. Nach 10 min fällt man mit 0,3 ml 20%iger Trichloressigsäure und zentrifugiert nach 10 min. Von dem klaren Zentrifugat entnimmt man 0,37 ml und behandelt sie wie oben angegeben. Durch den Zusatz von Eisen werden die β_1-Globuline abgesättigt. Der Überschuß reagiert mit o-Phenanthrolin und wird durch Zusatz von Salzsäure nicht in Freiheit gesetzt. Er fällt also mit dem Eiweißniederschlag aus und in dem Zentrifugat wird nur das eiweißgebundene Eisen bestimmt. Die Fehlergrenze liegt bei Serumeisen bei $\pm$ 1,6% für die Eisenbindungskapazität bei $\pm$ 4%. Die Arbeit enthält ausführliche Angaben über Normalwerte.

W. N. M. Ramsay[1] vereinfacht *die Bestimmung von Eisen im Blut, Plasma oder Serum* weitgehend. Zu 2 ml Serum gibt man 5 ml Reagens und Wasser auf 7,5 ml (Reagens: 0,5 m Acetatpuffer, p_H 5, mit 0,075% 2,2'-Dipyridyl und 0,1% Hydroxylaminhydrochlorid). Nach sorgfältigem Mischen wird 5 min im kochenden Wasserbad erwärmt; es bildet sich der Eisen(II)-dipyridylkomplex und die Eiweißkörper werden gefällt. Nach dem Abkühlen wird scharf zentrifugiert, dann durch ein kleines Filter, welches mit Salzsäure gewaschen ist, filtriert und die Intensität der roten Lösung bei 520 mμ gemessen. Die Ausbeuten schwanken zwischen 83—107%. K. Hinsberg.

Zur Bestimmung der Kohlenhydrate im Serumeiweiß wird von M. R. Shetlar[2] die früher gegebene Vorschrift[3] etwas modifiziert. Die Absorptionskurven für das Anthron-Tryptophan-Kohlenhydratreaktionsgemisch werden in bezug auf ihre Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen genau analysiert und ein Absorptionsmaximum bei 520 mμ gefunden. Ein zweites Absorptionsmaximum bei etwa 620 mμ nimmt mit zunehmendem Tryptophangehalt ab. Zur Bestimmung werden 0,2 ml 5fach verdünntes Serum mit 10 ml Äthanol gefällt, zentrifugiert, der Niederschlag mit 10 ml Äthanol ausgewaschen und getrocknet. Man löst in 1 ml 0,1%iger Tryptophanlösung und 2 ml Wasser und setzt gleichzeitig einen Standard mit je 25 μg Mannose und Galactose sowie einen Leerwert an. Die in Eis gekühlten Proben werden mit 6 ml Anthronreagens (0,15%ig in 95%iger Schwefelsäure) gut gemischt, 20 min im kochenden Wasserbad erhitzt und bei 520 mμ gemessen. Im menschlichen Serum finden sich im Mittel 159 mg% Serum-Polysaccharide, beim Hund 131 mg%. Peptide, auch Glutathion, stören in physiologischen Konzentrationen nicht. K. Hinsberg.

Zur Dextranbestimmung im Serum und Urin wird von W. Metcalf und L. M. Rousselot[4] vorgeschlagen, das Serum mit 5%iger Trichloressigsäure zu enteiweißen und das klare Filtrat mit der 10fachen Menge Äthylalkohol zu fällen. Die trübe Lösung wird sofort im Coleman-Junior 6 A-Spektrophotometer gegen einen Leerwert aus Wasser und Alkohol gemessen. Die Alkoholkonzentration muß mindestens 80% sein. Zur Ablesung eignet sich am besten die Wellenlänge von 440 mμ. Dann ist die Extinktion ungefähr proportional der Dextrankonzentration. Der Harn wird 10fach mit 5%iger Trichloressigsäure verdünnt und 1 Teil mit Alkohol gefällt, der andere Teil mit Wasser verdünnt, um als Leerwert zu dienen, damit die Eigenfarbe

[1] Biochemic. J. **53**, 227—231 (1953). Univ. Edinburgh.

[2] Analyt. Chemistry **24**, 1844—1846 (1952). Veterans Administr. Hosp. u. Oklahoma Medic. Res. Foundat., Oklahoma City, Okla. (USA).

[3] Shetlar, M. R., J. V. Foster und M. R. Everett: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **67**, 125 (1948).

[4] J. Lab. clin. Med. **40**, 901—906 (1952). St. Vincent's Hospital, New York City u. New York Univ. College of Medicine.

des Harns ausgeschaltet wird. Werden 500 ml 6%iger Dextranlösung intravenös gegeben, so fällt die Konzentration im Blut in Form einer Exponentialkurve ab, während sie spiegelbildlich im Harn ansteigt. Die Standardabweichung wird mit ± 2,93% angegeben. Im Harn stören hauptsächlich Oxalate und Urate, die aber ausfallen, wenn der Harn über Nacht im Eisschrank stehen bleibt. K. HINSBERG.

Zur Bestimmung von Glucosamin destilliert man nach M. V. TRACEY[1] langsam mit einer Phosphat-Boratmischung. Dabei wird Glucosamin unter Abspaltung von Ammoniak zersetzt. Durch colorimetrische Bestimmung des Ammoniaks kann der Glucosamingehalt berechnet werden. Die Phosphat-Boratmischung besteht aus gesättigter Na_3PO_4-Lösung, die bei Raumtemperatur mit $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ gesättigt wird. Eine Probe von 2 ml, die nicht stark sauer sein darf, wird mit 5 ml Phosphat-Boratlösung langsam destilliert (3 ml/min) und das Destillat in einem 10 ml-Kolben, der 1 ml 2%ige Borsäure enthält, aufgefangen. Sobald das Destillat 10ml erreicht hat, gibt man 1 ml NESSLER-Reagens zu und colorimetriert bei 490 mμ nach 30 min. Zahlreiche Aminosäuren, Pyrimidin- und Purinderivate, Betain, Cholin, Acetylglucosamin, Hyaluronsäure, Chitin spalten unter den Bedingungen der Arbeitsvorschrift kein Ammoniak ab und stören daher nicht. Ammoniumsalze, Asparagin, Nicotinamid, Harnstoff und Eiweiß stören. Wegen Beseitigung dieser Störungen sei auf die Originalarbeit verwiesen. Die Methode ist brauchbar für 5—50 μg Substanz und wird besonders empfohlen neben der Bestimmung nach L. A. ELSON und W. TH. J. MORGAN[2], um Fehler auszuschalten. K. HINSBERG.

Zur Bestimmung des Phenylalanins in Eiweißhydrolysaten untersuchen J.-P. ZALTA und YVONNE KHOUVINE[3] die Nitrierung unter verschiedenen Bedingungen, anschließend die Reduktion der Nitro- zu Aminoverbindungen, deren Diazotierung und die Kupplung mit α-Naphthylamin. Zur Nitrierung eignet sich am besten Schwefelsäure-Salpetersäure (10 g KNO_3 in 100 ml H_2SO_4). Die Reduktion kann mit Eisen(II)-salzen, Titan(III)-salzen oder $SnCl_2$ durchgeführt werden. Die besten Ausbeuten erhält man aber mit Zinkstaub. — *Arbeitsvorschrift.* Man verdampft die ungefähr 20—30 μg Phenylalanin enthaltende Lösung zur Trockne, gibt 2 ml Schwefelsäure-Salpetersäure zu und erhitzt 20 min im kochenden Wasserbad. Ein gleichartig zu behandelnder Leerwert läuft parallel. Nach dem Abkühlen fügt man genau 20 ml Wasser zu und reduziert unter Kühlung 1 Std lang mit 1 g Zinkstaub. Von dem Filtrat nimmt man 2 ml, gibt 2 ml n Natronlauge, dann wieder 1 ml nSalzsäure zu (das Zinkhydroxyd muß sich wieder vollkommen lösen), setzt dann 0,4 ml 0,1%ige Natriumnitritlösung zu und zerstört den Überschuß an Nitrit nach 1 min vollständig durch Zusatz von 1 ml 5%iger Ammoniumsulfaminatlösung. Nach 10 min gibt man 1 ml α-Naphthylaminlösung (0,5 g in 100 ml 20%iger Essigsäure) zu, läßt die Farbe sich 45—60 min entwickeln und colorimetriert nach Auffüllen mit Wasser auf 10 ml bei 540 mμ. Tryptophan stört die Reaktion, ist aber bei den sauren Eiweißhydrolysaten bereits abgebaut. Die Störungen durch große Überschüsse an Tyrosin werden ausgeschaltet, wenn man der Vergleichslösung die gleiche Menge Tyrosin zugibt. In zwei Eiweißarten, dem Insulin und Lysozymm, wurde das Phenylalanin nach der oben beschriebenen Vorschrift und mikrobiologisch bestimmt und dabei zufriedenstellende Übereinstimmung festgestellt. Bei dem Lysozymm sind die Schwankungen größer. Die Verfasser glauben, daß ihr Verfahren vorteilhafter als die mikrobiologische Methode ist. Wenn die Lösung noch Tryptophan enthält, so kann dieses durch $KMnO_4$ zerstört werden. K. HINSBERG.

[1] Biochemic. J. **52**, 265—267 (1952). Rothamsted Experim. Station, Harpenden, Herts. (England).

[2] Biochemic. J. **27**, 1824 (1933); vgl. diese Z. **103**, 376 (1935).

[3] Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **34**, 937—945 (1952). Inst. Biol. phys.-chim., Paris.